

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la Propriété
Intellectuelle
Bureau international



(43) Date de la publication internationale
16 mai 2002 (16.05.2002)

PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 02/38792 A2

(51) Classification internationale des brevets⁷ : C12Q

Joffre, F-92250 La Garenne-Colombes (FR). TROUPLIN,
Virginie [FR/FR]; 70, avenue d'Italie, F-75013 Paris (FR).

(21) Numéro de la demande internationale :
PCT/FR01/03512

(74) Mandataires : BREESE, Pierre etc.; Breese-Majerowicz,
3, avenue de l'Opéra, F-75001 Paris (FR).

(22) Date de dépôt international :
9 novembre 2001 (09.11.2001)

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :
00/14495 10 novembre 2000 (10.11.2000) FR
01/03970 23 mars 2001 (23.03.2001) FR
09/817,135 27 mars 2001 (27.03.2001) US

(81) États désignés (national) : AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ,
BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ,
DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM,
HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK,
LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX,
MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI,
SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU,
ZA, ZW.

(84) États désignés (régional) : brevet ARIPO (GH, GM, KE,
LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), brevet eurasien
(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen
(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU,
MC, NL, PT, SE, TR), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI,
CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(71) Déposants (pour tous les États désignés sauf US) :
BIOALLIANCE PHARMA [FR/FR]; 59, rue du Général
Martial Valin, F-75015 Paris (FR). INSERM [FR/FR];
101, rue de Tolbiac, F-75654 Paris Cedex 13 (FR).

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (pour US seulement) : CLAVEL,
François [FR/FR]; 31, boulevard Malesherbes, F-75008
Paris (FR). MAMMANO, Fabrizio [FR/FR]; 43, rue
Réaumur, F-75003 Paris (FR). RACE, Esther [FR/FR];
62, avenue Aristide Briand, F-92120 Montrouge (FR).
DAM, Elisabeth [FR/FR]; 87, rue Championnet, F-75018
Paris (FR). OBRY, Véronique [FR/FR]; 31bis, avenue

Publiée :

— sans rapport de recherche internationale, sera republiée
dès réception de ce rapport

En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abrévia-
tions, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et
abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de
la Gazette du PCT.

(54) Title: NOVEL METHOD FOR ANALYSING PHENOTYPIC CHARACTERISTICS OF HUMAN IMMUNODEFICIENCY
VIRUS (HIV)

(54) Titre : NOUVELLE METHODE D'ANALYSE DES CARACTERISTIQUES PHENOTYPIQUES DES VIRUS DE L'IMMU-
NODEFICIENCE HUMAINE (VIH)

(57) Abstract: The invention concerns a method for analysing characteristics exhibited by certain virus strains, in particular, the
human immunodeficiency viruses, using the construct of a recombinant virus obtained by homologous recombining. The invention
also concerns a kit comprising primers, vectors, cell hosts, products and reagents necessary for producing PCR amplification, and
the products and reagents for detecting a marker, for implementing the inventive method.

(57) Abrégé : La présente invention concerne une méthode d'analyse des caractéristiques phénotypiques présentées par certaines
souches de virus, notamment les virus de l'immunodéficience humaine, mettant en oeuvre la construction d'un virus recombinant
obtenu par recombinaison homologue. La présente invention concerne également un kit comprenant les amorces, les vecteurs, les
hôtes cellulaires, les produits et réactifs nécessaires pour réaliser une amplification par PCR, et les produits et réactifs permettant la
détection d'un marqueur, pour la mise en oeuvre de la méthode de l'invention.

WO 02/38792 A2

BEST AVAILABLE COPY

NOUVELLE METHODE D'ANALYSE DES CARACTERISTIQUES
PHENOTYPIQUES DES VIRUS DE L'IMMUNODEFICIENCE HUMAINE
(VIH)

5 La présente invention concerne une méthode
d'analyse des caractéristiques phénotypiques qui
présentent certaines souches de virus, notamment de virus
VIH.

10 Des tests génotypiques qui sont rapides et
largement disponibles pour détecter la présence de
mutations dans les gènes viraux ont été développées par
exemple pour détecter des mutations présentes dans les
gènes codant pour la protéase ou la transcriptase inverse
de VIH.

15 Bien que certaines mutations aient été
associées à un inhibiteur particulier de l'activité
virale, bien d'autres sont associés avec le traitement
par plusieurs molécules. De plus, avec le développement
de nouvelles molécules d'inhibiteurs, le génotypage de
20 variantes des virus qui échappent aux traitements devient
de plus en plus complexe. Ceci rend difficile
l'évaluation et le fait de savoir vis-à-vis de quels
inhibiteurs les virus deviennent résistants ou conservent
encore une légère susceptibilité. Dans ces circonstances,
25 la présence et l'accumulation de mutations de résistance
peuvent sûrement constituer un bon indice de l'évolution
de la résistance, mais la simple détection de ces
mutations au niveau génotypique ne suffit plus pour
évaluer quantitativement le niveau de résistance, un
30 paramètre qui s'avère crucial pour optimiser les
orientations thérapeutiques de patients chez qui la
thérapie antivirale est défaillante.

Les caractéristiques phénotypiques des virus sont liées aux divers aspects du comportement viral et directement impliquées dans des nombreuses interactions entre lesdits virus et leur environnement.

5

Seuls les tests phénotypiques, qui mesurent directement dans le milieu de culture la modification de la caractéristique phénotypique du virus, telle que l'inhibition de l'activité virale, par exemple en présence de composés inhibiteurs de ladite activité virale, fournissent un indice quantitatif de la résistance.

D'autres caractéristiques phénotypiques dont l'analyse s'avère intéressant, notamment d'un point de vue médical, sont celles qui confèrent à un virus sa résistance vis-à-vis des agents inhibiteurs susceptibles de bloquer au moins un mécanisme impliqué dans l'activité virale, celles qui confèrent à un virus sa capacité répllicative, celles qui confèrent à un virus son tropisme envers des cibles particulières ou encore celles qui confèrent à un virus son aptitude à être neutralisé par des molécules, tels des anticorps, des chimiokines ou des inhibiteurs.

25

La présente invention permet de tester plusieurs caractéristiques phénotypiques distinctes mais complémentaires du VIH, à l'aide d'une méthode rapide reposant sur la reconstruction d'un virus recombinant à partir de prélèvements effectués chez des patients infectés et faisant intervenir un cycle unique de réplication virale. Cette invention s'inscrit dans une démarche d'aide à la décision et d'optimisation de la

30

stratégie thérapeutique chez les patients infectés par le VIH se trouvant dans une situation d'échec virologique de traitement antirétroviral, ou encore chez des patients naïfs de traitement antirétroviral. Seule une connaissance complète des différentes caractéristiques phénotypiques du virus peut aider efficacement le clinicien à prendre les décisions thérapeutiques les mieux adaptées à la situation particulière de son patient.

Parmi les caractéristiques phénotypiques du virus VIH dont l'analyse présente un intérêt particulier du point de vue médical, se trouvent celles liées à l'expression des gènes, susceptibles de subir au moins une mutation, situés dans les régions GAG, ENV, ou POL du génome viral, telles que celles ci-dessous énumérées :

I Infectivité, capacité répllicative et virulence.

Ces caractéristiques phénotypiques des virus VIH peuvent être liées à la fonction de toutes les régions du génome virale, qu'il s'agisse des parties codant pour des protéines ou des régions intervenant dans les différents mécanismes ou étapes du cycle réplcatif viral. En particulier il est important d'évaluer l'effet produit par les mutations dans le gènes codant pour la protéase, la transcriptase inverse, l'intégrase ou l'enveloppe sur la répllication des virus et tout particulièrement chez les virus ayant développé une résistance aux agents antiviraux.

Son analyse permet de mesurer la capacité répliquative d'un virus, aussi appelée infectivité ou " fitness ".

5 II Susceptibilité/Résistance aux inhibiteurs de transcriptase inverse.

Cette caractéristique phénotypique des virus VIH est liée à l'expression d'une partie de la région POL codant pour la transcriptase inverse.

10 Son analyse permet l'ajustement des traitements antirétroviraux par les analogues nucléosidiques ou les inhibiteurs de transcriptase inverse non nucléosidiques (NNRTI).

15 III Susceptibilité/Résistance aux inhibiteurs d'intégrase.

Cette caractéristique phénotypique des virus VIH est liée à l'expression d'une partie de la région POL codant pour l'intégrase.

20 Son analyse fournit des indications pour l'ajustement des traitements antirétroviraux par les inhibiteurs d'intégrases.

25 IV. Susceptibilité/Résistance aux inhibiteurs d'entrée du virus dans la cellule cible.

Cette caractéristique phénotypique des virus VIH est liée à l'expression de la glycoprotéine d'enveloppe du VIH et en particulier à l'expression de la sous-unité transmembranaire de ladite glycoprotéine codée par une partie du gène ENV.

30 L'analyse de cette caractéristique phénotypique permet la mise en évidence de l'action des

agents inhibiteurs qui bloquent la fusion de la membrane virale avec la membrane de la cellule cible.

5 V Susceptibilité/Résistance aux inhibiteurs ciblant les corécepteurs des virus VIH.

Cette caractéristique phénotypique est liée également à l'expression d'au moins une partie de la région ENV des virus VIH qui code pour des polypeptides qui se participent à la liaison avec des corécepteurs de la cellule cible. L'interaction enveloppe/corécepteur permet l'entrée du virus VIH dans ladite cellule cible.

10 Son analyse permet de mesurer la résistance des virus VIH à l'action des inhibiteurs bloquant les corécepteurs utilisés par le VIH pour effectuer son entrée dans la cellule cible.

15 Les agents inhibiteurs interfèrent avec le co-récepteur en inhibant son interaction avec l'enveloppe du VIH.

20 En particulier il est important d'évaluer l'effet des mutations dans la région ENV qui modifient l'interaction de certaines régions de la protéine d'enveloppe avec les récepteurs CXCR4 ou CCR5 des cellules cible des VIH.

25 VI Tropicisme

Cette caractéristique phénotypique est aussi liée à l'expression d'au moins une partie de la région ENV codant pour des polypeptides de l'enveloppe des virus VIH, qui participent à la liaison avec un ou plusieurs récepteurs de la cellule cible, en particulier avec les corécepteurs CXCR4 ou CCR5

30 Son analyse permet de mesurer in vivo la capacité du virus VIH à utiliser lesdits récepteurs,

notamment CXCR4 ou CCR5, qui sont exprimés de façon différente dans divers types cellulaires et permet de savoir si le virus utilise l'un ou l'autre des récepteurs, ou les deux.

5 Les indications fournies par cette analyse permettent de déduire le comportement viral dans certains types de cellules, cibles naturelles des VIH.

VII Virulence.

10 Cette caractéristique phénotypique est aussi liée à l'expression de tout ou partie de la région ENV qui code pour les polypeptides d'enveloppe des virus VIH.

Son analyse permet d'évaluer le pouvoir cytopathogène d'un virus VIH.

15

VIII Capacité neutralisante.

Cette caractéristique phénotypique est aussi liée à l'expression des protéines d'enveloppe des virus VIH.

20

Son analyse permet d'évaluer la susceptibilité des virus à l'action inhibitrice des anticorps ou des substances naturellement présentes dans l'organisme et présentes dans le sérum ou dans d'autres fluides.

25

Les premiers tests pour détecter par exemple la caractéristique phénotypique de résistance des virus VIH aux traitements antiviraux ont été effectués en utilisant des isolats primaires et des lymphocytes du sang périphérique (PBL) stimulés par de la phytoagglutinine (PHA) selon une procédure laborieuse et difficilement reproductible. Une alternative innovante à ces tests, un test de virus recombinant, ci-après nommé RVA, a été proposée par Kellam et Larder en 1994.

30

Cette méthode d'analyse RVA, mesurait la résistance d'un virus recombinant portant la transcriptase inverse isolé du plasma d'un patient porteur du virus par co-transfection des séquences de celui-ci dûment amplifiées par une réaction de polymérisation en chaîne (PCR), avec un clone de virus obtenu en laboratoire, lequel est délété de sa transcriptase inverse et est compétent pour la répllication dans une variété de lignées cellulaires bien établies.

Plusieurs modifications de cette méthode ont maintenant été décrites (Boucher, C., Keulen, W., Bommel, T., Nijhuis, M., Jong, D., Jong, M., Schipper, P. and Back, N., K. (1996) « HIV-1 drug susceptibility determination by using recombinant viruses generated from patient sera tested in a cell-killing assay. Antimicrobial Agents and Chemotherapy" 40(10), 2404-2409) (Shi, C. and Mellors, J.W. (1997) "A recombinant retroviral system for rapid in vivo analysis of human immunodeficiency virus type 1 susceptibility to reverse transcriptase inhibitors". Antimicrob Agents Chemother 41(12), 2781-5) (Hertogs, K., de Bethune, M.P., Miller, V., Ivens, T., Schel, P., Van Cauwenberge, A., Van Den Eynde, C., Van Gerwen, V., Azijn, H., Van Houtte, M., Peeters, F., Staszewski, S., Conant, M., Bloor, S., Kemp, S., Larder, B. and Pauwels, R. (1998) "A rapid method for simultaneous detection of phenotypic resistance to inhibitors of protease and reverse transcriptase in recombinant human immunodeficiency virus type 1 isolates from patients treated with antiretroviral drugs". Antimicrob Agents Chemother 42(2), 269-76.) (Hecht, F.M., Grant, R.M., Petropoulos, C.J., Dillon, B., Chesney,

M.A., Tian, H., Hellmann, N.S., Bandrapalli, N.I., Digilio, L., Branson, B. and Kahn, J.O. (1998) "Sexual transmission of an HIV-1 variant resistant to multiple reverse-transcriptase and protease inhibitors". N Engl J Med 339(5), 307-11) (Medina, D.J., Tung, P.P., Nelson, C.J., Sathya, B., Casareale, D. and Strair, R.K. (1998) "Characterization and use of a recombinant retroviral system for the analysis of drug resistant HIV". J Virol Methods 71(2), 169-76).

Cependant, la plupart de ces systèmes recombinants présentent des inconvénients car, comme pour la méthode utilisant des PBMC, la production d'une réserve de particules infectieuses exprimant une caractéristique phénotypique particulière que l'on cherche à détecter et à mesurer nécessite une amplification du virus par croissance exponentielle des cellules lymphocytaires. Le virus est alors soumis à des dérives génétiques pendant sa répllication et peut perdre des mutations qui sont essentielles pour l'expression de la caractéristique phénotypique recherchée modifiant ainsi la fiabilité de la méthode.

Un autre inconvénient pour déceler par exemple une caractéristique phénotypique de résistance qui est présent dans les méthodes d'analyse de l'art antérieur provient du fait que la présence simultanée de plusieurs mutations susceptibles de conférer une résistance vis-à-vis des différents inhibiteurs rétroviraux réduit la capacité répllicative du virus.

Les inventeurs ont développé une nouvelle méthode d'analyse d'une caractéristique phénotypique des virus VIH qui ne nécessite qu'un cycle unique de répllication.

Cette méthode ne nécessitant qu'un seul cycle de réplication virale est mise en œuvre par le choix des conditions de culture des virus recombinants obtenues.

5 Ces conditions de culture concernent, soit le contrôle du temps de culture, choisi pour empêcher la réplication virale au delà du premier cycle, ce temps de culture est compris entre 12 heures à 72 heures, de préférence de 24 heures à 48 heures.

10

Les conditions de culture concernent également le choix des cellules du premier système cellulaire, elles sont choisies de manière à ce qu'elles ne soient pas permissives à l'infection virale, par exemple de telles cellules ne possèdent pas le récepteur CD4 nécessaire à l'entrée du virus VIH dans la cellule. Des exemples de telles cellules sont les cellules HeLa ou 293T.

20

Enfin, ces conditions de culture concernent aussi les virus recombinants construits selon la méthode de l'invention, qui présentent un déficit en protéine d'enveloppe. Ces virus, une fois produits dans le premier système cellulaire, sont de fait incapables de re-

25

infecter les cellules de ce premier système cellulaire.

Cette méthode d'analyse est basée sur la construction d'un virus recombinant (RAV) obtenu par co-transfection et recombinaison homologue avec :

30

a) les séquences d'ADN obtenues à partir d'un VIH à analyser susceptibles de comprendre des mutations susceptibles de modifier la caractéristique phénotypique recherchée, lesdites séquences étant extraites d'un

milieu biologique tel que le plasma, le sérum, la salive, le sperme ou autres sécrétions, d'un patient porteur dudit virus,

5 b) un premier vecteur présentant une délétion spécifique des séquences permettant la réplication du VIH ainsi qu'une délétion de tout ou partie de la séquence conférant au VIH la caractéristique phénotypique recherchée et

10 c) un deuxième vecteur, par exemple un plasmide, comprenant les séquences complétant celles nécessaires à la réplication dudit virus et qui sont absentes du premier vecteur.

15 La méthode développée par les inventeurs est rapide, elle nécessite environ sept jours pour être réalisée et peut donc être utilisé pour des déterminations de routine tels que la mesure de la susceptibilité des patients infectés par des VIH aux inhibiteurs de l'activité virale.

20 Ainsi, les inventeurs ont déjà décrit dans le brevet US 6 103 462 une première application de cette méthode d'analyse, basée sur la formation d'un virus recombinant particulier, pour déterminer la susceptibilité d'un virus VIH à des inhibiteurs de la
25 protéase.

30 Les nouvelles méthodes d'analyse mises en œuvre dans le cadre de la présente invention VIH, sont basées sur la détermination de caractéristiques phénotypiques des virus VIH associées à des mutations susceptibles d'être présentes au moins dans un gène choisi parmi le groupe comprenant les gènes gag, pol, protéase, transcriptase inverse, RNase H, intégrase, vif,

vpr, tat, rev, vpu, env, nef, séquences cis-actives, LTR, séquences de dimérisation, séquences régulatrices de l'épissage, RRE au moyen de virus recombinants ad-hoc.

5 L'invention concerne donc une méthode d'analyse d'une caractéristique phénotypique des virus VIH présents dans un échantillon biologique d'un patient, ladite caractéristique phénotypique résultant d'une ou
10 plusieurs mutations du génome viral susceptibles d'influencer l'infection virale, caractérisée en ce qu'elle comprend :

a) l'extraction des acides nucléiques contenus dans un échantillon biologique,

15 b) au moins une amplification par PCR d'un segment des acides nucléiques de l'étape (a), chacune avec une paire d'amorces encadrant une séquence d'acide nucléique du génome viral susceptible de porter au moins une mutation,

20 c) la préparation d'un vecteur comprenant les parties d'un génome d'un virus VIH nécessaires à la réplication virale à l'exception du segment amplifié à l'étape (b) et éventuellement à l'exception du gène codant pour la protéine d'enveloppe,

25 d) la transfection d'un premier hôte cellulaire avec :

- les acides nucléiques obtenus à l'étape (b),

- le vecteur préparé à l'étape (c),

30 - éventuellement un second vecteur comprenant un gène codant pour une protéine d'enveloppe si le gène d'enveloppe est délété du vecteur préparé à l'étape (c),

pour obtenir par recombinaison homologue un virus chimérique,

e) la culture dudit premier hôte cellulaire dans des conditions permettant de produire des particules virales au cours d'un seul cycle de réplication,

5 f) l'infection par les particules virales obtenues à l'étape (e) d'au moins un second hôte cellulaire susceptible d'être infecté par un virus VIH ou un virus pseudotypé VIH et comportant éventuellement un gène marqueur activable uniquement à la suite de l'infection virale, et

10 g) la détection et/ou la quantification du marqueur exprimé à l'étape (f) afin de mettre en évidence au moins une caractéristique phénotypique des virus VIH présents dans l'échantillon biologique.

15 Plus particulièrement, l'amplification par PCR de l'étape (b) est réalisée avec une paire d'amorces encadrant une séquence d'acide nucléique comprenant tout ou partie d'une région du génome virale choisie parmi:
20 gag, pol, protéase, transcriptase inverse, RNase H, intégrase, vif, vpr, tat, rev, vpu, env, nef, séquences cis-actives, LTR, séquences de dimérisation, séquences régulatrices de l'épissage ou l'élément de réponse de Rev (RRE).

25 Selon un mode de mise en œuvre particulier de la méthode d'analyse de l'invention, l'amplification par PCR de l'étape (b) est réalisée avec une paire d'amorces encadrant une séquence d'acide nucléique codant pour une partie de la protéine gag du virus de l'immunodéficience
30 humain et une séquence d'acide nucléique codant pour la protéase, susceptible de porter au moins une mutation dans le gène codant pour la protéase et, en ce que le vecteur de l'étape (c) est construit à partir d'un génome

d'un virus VIH où tout ou partie du gène codant pour la protéase est délété.

Avantageusement, l'amplification de l'étape
5 (b) selon la méthode d'analyse de l'invention, d'une
séquence d'acide nucléique susceptible de porter au moins
une mutation dans le gène codant pour la protéase est
effectuée avec une paire d'amorces ayant une taille
comprise entre 10 et 50 oligonucléotides, comprenant les
10 séquences Fit A - : (5' TCA CCT AGA ACT TTA AAT GC 3')
(SEQ ID No : 1) et Pro A- : (5' GGC AAA TAC TGG AGT ATT
GTA TG3' 3') (SEQ ID No : 2), ou constitués par des
fragments de celles-ci, ou encore des séquences analogues
de celles-ci portant des mutations d'un ou plusieurs
15 nucléotides qui ne modifient pas de manière essentielle
leur capacité à hybrider la région du gène de la protéase
portant la ou les mutations, suivie d'une deuxième
amplification avec une paire d'amorces ayant une taille
comprise entre 10 et 50 oligonucléotides, comprenant les
20 séquences : Fit B : (5' AGA ACT TTA AAT GCA TGG GT 3')
(SEQ ID No : 3) et Pro B- : (5' GGA GTA TTG TAT GGA TTT
TCA GG 3') (SEQ ID No : 4), ou constitués par des
fragments de celles-ci, ou encore des séquences analogues
de celles-ci portant des mutations d'un ou plusieurs
25 nucléotides qui ne modifient pas de manière essentielle
leur capacité à hybrider la région du gène de la protéase
portant la ou les mutations

Tout préférentiellement, l'amplification de
30 l'étape (b) selon la méthode d'analyse de l'invention,
d'une séquence d'acide nucléique susceptible de porter au
moins une mutation dans le gène codant pour la protéase
est effectuée avec une paire d'amorces :

Fit A - : (5' TCA CCT AGA ACT TTA AAT GC 3')
(SEQ ID No : 1) et

Pro A- : (5' GGC AAA TAC TGG AGT ATT GTA TG3'
3') (SEQ ID No : 2),

5 suivie d'une deuxième amplification avec une
paire d'amorces :

Fit B : (5' AGA ACT TTA AAT GCA TGG GT 3')
(SEQ ID No : 3) et

10 Pro B- : (5' GGA GTA TTG TAT GGA TTT TCA GG
3') (SEQ ID No : 4),

pour obtenir un segment d'ADN de 1488 paires
de bases, s'étendant entre les résidus 1237 et 2725
inclus, et le vecteur de l'étape (c) est un vecteur
retroviral délété de la région du cadre de lecture pol
15 codant pour la protéase du VIH-1 s'étendant des résidus
1505 à 2565 inclus, délété de la région d'enveloppe et
comportant un site unique de restriction MluI.

Selon un deuxième mode de mise en œuvre
20 particulier de la méthode d'analyse de l'invention,
l'amplification par PCR de l'étape (b) de la méthode
d'analyse selon l'invention est réalisée avec une paire
d'amorces encadrant une séquence d'acide nucléique
susceptible de porter au moins une mutation dans le gène
25 codant pour la transcriptase inverse, et la transfection
de l'étape (c) est réalisée avec un premier vecteur
construit à partir d'un génome d'un virus VIH où tout ou
partie du gène codant pour la transcriptase inverse est
délété.

30

Avantageusement, l'amplification de l'étape
(b) selon la méthode d'analyse de l'invention, avec une
paire d'amorces encadrant une séquence d'acide nucléique

susceptible de porter au moins une mutation dans le gène codant pour la transcriptase inverse est effectuée avec une paire d'amorces ayant une taille comprise entre 10 et 50 oligonucléotides, comprenant les séquences MJ3 (5' AGT AGG ACC TAC ACC TGT CA 3') (SEQ ID No : 5) et RT-EXT (5' TTC CCA ATG CAT ATT GTG AG 3') (SEQ ID No : 6), ou constitués par des fragments de celles-ci, ou encore des séquences analogues de celles-ci portant des mutations d'un ou plusieurs nucléotides qui ne modifient pas de manière essentielle leur capacité à hybrider la région du gène de la transcriptase portant au moins une mutation, suivie d'une deuxième étape d'amplification avec une paire d'amorces comprenant les séquences : A35 (5' TTG GTT GCA TAA ATT TTC CCA TTA GTC CTA TT 3') (SEQ ID No : 7) et RT-IN (5' TTC CCA ATG CAT ATT GTG AG 3') (SEQ ID No : 8) ou constitués par des fragments de celles-ci, ou encore des séquences analogues de celles-ci portant des mutations d'un ou plusieurs nucléotides qui ne modifient pas de manière essentielle leur capacité à hybrider la région du gène de la transcriptase inverse portant au moins une mutation.

Tout préférentiellement, l'amplification de l'étape (b) selon la méthode d'analyse de l'invention, avec une paire d'amorces encadrant une séquence d'acide nucléique susceptible de porter au moins une mutation dans le gène codant pour la transcriptase inverse est effectuée avec une paire d'amorces :

MJ3 (5' AGT AGG ACC TAC ACC TGT CA 3') (SEQ ID No : 5) et
RT-EXT (5' TTC CCA ATG CAT ATT GTG AG 3') (SEQ ID No : 6),

suivie d'une deuxième étape d'amplification avec une paire d'amorces :

A35 (5' TTG GTT GCA TAA ATT TTC CCA TTA GTC CTA TT 3') (SEQ ID No : 7) et

5 RT-IN (5' TTC CCA ATG CAT ATT GTG AG 3') (SEQ ID No : 8)

10 pour obtenir un segment d'ADN de 1530 paires de bases s'étendant au-delà du codon 93 de la région codant pour la protéase et au-delà du codon 503 de la région codant pour la polymérase (POL) et le vecteur de l'étape (c) est un vecteur retroviral délété de la région du cadre de lecture pol codant pour la transcriptase inverse du VIH-1, s'étendant des résidus 2618 à 2872 inclus, et comportant un site unique de restriction MluI.

15

Selon un troisième mode de mise en œuvre, l'invention a également pour objet une méthode d'analyse selon laquelle l'amplification de l'étape (b) est effectuée avec une paire d'amorces encadrant une séquence d'acide nucléique codant pour une partie de la protéine gag, pour la protéase et pour une partie de la transcriptase inverse du virus de l'immunodéficience humaine susceptible de porter au moins une mutation dans la séquence d'acide nucléique codant pour la protéine gag, ou pour la protéase ou pour la transcriptase inverse.

25

Tout préférentiellement l'amplification de l'étape (b) avec une paire d'amorces encadrant une séquence d'acide nucléique codant pour une partie de la protéine gag, pour la protéase et pour une partie de la transcriptase inverse du virus de l'immunodéficience humaine susceptible de porter au moins une mutation dans

30

la séquence d'acide nucléique codant pour la protéine gag, ou pour la protéase ou pour la transcriptase inverse est effectuée avec la paire d'amorces :

5 gag+1 (5' AGGGGCAAATGGTACATCA 3') (SEQ ID No : 31) et

RT-EX (SEQ ID n° 6),

suivie d'une deuxième étape d'amplification avec une paire d'amorces :

Fit B+ (SEQ ID No : 1) et

10 RT-IN (SEQ ID No : 8)

pour obtenir un segment d'ADN de 2825 paires de bases, s'étendant entre les résidus 1237 et 4062 et la transfection de l'étape (c) est réalisée avec un vecteur retroviral délété d'une partie du gène gag et des régions du cadre de lecture pol codant pour la protéase et une
15 partie de la transcriptase inverse du VIH-1 s'étendant des résidus 1507 à 3870 inclus, délété dans la région d'enveloppe et comportant un site unique de restriction NruI.

20

Avantageusement, le virus résultant de la transfection mentionnée ci-dessus peut être utilisé pour déterminer la capacité infective ou répliquative du virus
25 présentant des mutations dans la transcriptase inverse et/ou la protéase. La quantification des particules virales selon cette dernière méthode d'analyse es accomplie par la mesure de l'antigène p24. Il est a signaler qu'une méthode d'analyse similaire ne peut en aucun cas être effectuée en utilisant un vecteur délété
30 simplement de la séquence de la transcriptase inverse puisque ces virus recombinants non-viables peuvent encore produire l'antigène p24. En construisant un virus recombinant présentant une déletion additionnelle de la

région correspondante à la protéase, seulement les virus correctement recombines produisent l'antigène p24 et permettent ainsi une mesure sûre et fiable des particules virales produites.

5

L'invention concerne également une méthode d'analyse pour déterminer la susceptibilité d'un virus VIH à un composé inhibiteur de la transcriptase inverse, consistant à ajouter ou non ledit composé inhibiteur de la transcriptase inverse, éventuellement à des concentrations différentes, au deuxième hôte cellulaire, préalablement à l'infection de celui-ci par les particules virales obtenues à l'étape (e), et comprenant à l'étape (g) la comparaison de l'expression du gène marqueur avec et sans composé inhibiteur de la transcriptase inverse

Selon un troisième mode de mise en oeuvre particulier de la méthode d'analyse de l'invention, l'amplification par PCR de l'étape (b) est réalisée avec une paire d'amorces encadrant une séquence d'acide nucléique susceptible de porter au moins une mutation dans le gène codant pour l'intégrase, et le vecteur de l'étape (c) est un vecteur retroviral délété de tout ou partie du gène codant pour l'intégrase.

Avantageusement, l'amplification de l'étape (b) selon la méthode d'analyse de l'invention avec une paire d'amorces encadrant une séquence d'acide nucléique susceptible de porter au moins une mutation dans le gène codant pour l'intégrase est effectuée avec la paire d'amorces ayant une taille comprise entre 10 et 50 oligonucléotides, comprenant les séquences :INT B+ -

5'GTTACTAATAGAGGAAGACAAA3' (SEQ ID No: 9) et INT B-
5'TTTTGGTGTTATTAATGCT3' (SEQ ID No: 10), ou encore des
séquences analogues de celles-ci portant des mutations
d'un ou plusieurs nucléotides qui ne modifient pas de
manière essentielle leur capacité à hybrider la région du
gène de l'intégrase portant au moins une mutation, suivie
d'une deuxième étape d'amplification, avec la paire
d'amorces : INT V+ 5'CACCCTAACTGACACAACAA3' (SEQ ID No:
11) et INT V- 5'AAGGCCTTTCTTATAGCAGA3' (SEQ ID No: 12),
ou encore des séquences analogues de celles-ci portant
des mutations d'un ou plusieurs nucléotides qui ne
modifient pas de manière essentielle leur capacité à
hybrider la région du gène de l'intégrase portant au
moins une mutation.

15

Tout préférentiellement, l'amplification de
l'étape (b) selon la méthode d'analyse de l'invention
avec une paire d'amorces encadrant une séquence d'acide
nucléique susceptible de porter au moins une mutation
dans le gène codant pour l'intégrase est effectuée avec
la paire d'amorces :

20

INT B+ -5'GTTACTAATAGAGGAAGACAAA3' (SEQ ID
No: 9) et

25

INT B- 5'TTTTGGTGTTATTAATGCT3' (SEQ ID No:
10),

suivie d'une deuxième étape d'amplification,
avec la paire d'amorces :

INT V+ 5'CACCCTAACTGACACAACAA3' (SEQ ID No:
11) et

30

INT V- 5'AAGGCCTTTCTTATAGCAGA3' (SEQ ID No:
12),

pour obtenir un fragment d'ADN de 1460 paires
de bases s'étendant des résidus 3950 à 5410 inclus et le

vecteur de l'étape (c) est un vecteur retroviral délété de toute la région du cadre de lecture pol codant pour l'intégrase du VIH-1 s'étendant des résidus 4228 à 5093 inclus et de la région codant pour l'enveloppe virale entre les positions 6343 et 7611 incluses.

L'invention concerne également une méthode d'analyse pour déterminer la susceptibilité d'un virus VIH à un composé inhibiteur de l'intégrase, consistant à ajouter ou non ledit composé inhibiteur de l'intégrase, éventuellement à des concentrations différentes, durant l'étape (e), avant l'étape (f) et comprenant à l'étape (g) la comparaison de l'expression du gène marqueur avec et sans composé inhibiteur de l'intégrase.

Selon un quatrième mode particulier de mise en œuvre de la méthode d'analyse de l'invention l'amplification par PCR de l'étape (b) est réalisée avec une paire d'amorces encadrant une séquence d'acide nucléique susceptible de porter au moins une mutation dans le gène codant pour la protéine d'enveloppe, et le vecteur de l'étape (c) est un vecteur retroviral construit à partir d'un génome d'un virus VIH où tout ou partie du gène codant pour la protéine d'enveloppe est délété.

Préférentiellement le vecteur de l'étape (c) est un vecteur retroviral délété de toute la région codant pour la portion extracellulaire de la sous-unité gp41 de l'enveloppe du VIH-1, s'étendant des résidus 7745 à 8263 inclus, de la région du génome VIH-1 constitutrice de l'élément de réponse à Rev (RRE).

Avantageusement, l'amplification de l'étape (b) avec une paire d'amorces encadrant une séquence d'acide nucléique susceptible de porter au moins une mutation dans le gène codant pour la protéine d'enveloppe est effectuée avec une paire d'amorces ayant une taille comprise entre 10 et 50 oligonucléotides, comprenant soit les séquences : FIN-A : 5'TCAAATATTACAGGGCTGCT3' (SEQ ID No: 13) et FIN-B : 5'TAGCTGAAGAGGCACAGG3' (SEQ ID No: 14), soit les séquences FuA : 5'AAGCAATGTATGCCCTCCCAT3' (SEQ ID No: 23) et FuB : 5' GGTGGTAGCTGAAGAGGCACAGG3' (SEQ ID No: 24) ou constitués par des fragments de celles-ci ou encore par des séquences analogues de celles-ci portant des mutations d'un ou plusieurs nucléotides qui ne modifient pas de manière essentielle leur capacité à hybrider la région du gène de l'enveloppe portant au moins une mutation suivie d'une deuxième étape d'amplification, effectuée avec une paire d'amorces ayant une taille comprise entre 10 et 50 oligonucléotides, comprenant soit les séquences : FIN-C : 5'CTATTAACAAGAGATGGTGG3' (SEQ ID No: 15) et FIN-D : 5'TCCACCTTCTTCTTCGATT3' (SEQ ID No: 16), soit les séquences FuC' : 5'ATATGAGGGACAATTGGAGAAGTGA3' (SEQ ID No: 25), utilisée en combinaison avec un mélange de deux séquences suivantes: FuD1 : 5'TCTGTCTCTCTCTCCACCTTCTTCTT3' (SEQ ID No: 26) et FuD2 : 5'TCTGTCTTGCTCTCCACCTTCTTCTT3' (SEQ ID No: 27) ou constitués par des fragments de celles-ci, ou encore par des séquences analogues de celles-ci portant des mutations d'un ou plusieurs nucléotides qui ne modifient pas de manière essentielle leur capacité à hybrider la région du gène de l'enveloppe portant au moins une mutation

Tout préférentiellement, l'amplification de l'étape (b) avec une paire d'amorces encadrant une séquence d'acide nucléique susceptible de porter au moins une mutation dans le gène codant pour la protéine d'enveloppe est effectuée avec une paire d'amorces :

FIN-A : 5'TCAAATATTACAGGGCTGCT3' (SEQ ID No: 13) et

FIN-B : 5'TAGCTGAAGAGGCACAGG3' (SEQ ID No: 14) suivie d'une deuxième étape d'amplification, effectuée avec la paire d'amorces :

FIN-C : 5'CTATTAACAAGAGATGGTGG3' (SEQ ID No: 15) et

FIN-D : 5'TCCACCTTCTTCTTCGATT3' (SEQ ID No: 16),

pour obtenir un segment d'ADN de 965 paires de bases s'étendant des résidus 7553 à 8517 inclus et le vecteur de l'étape (c) est un vecteur retroviral délété de toute la région codant pour la portion extracellulaire de la sous-unité gp41 de l'enveloppe du VIH-1, s'étendant des résidus 7745 à 8263 inclus, et comporte un site de restriction unique Mull.

Tout préférentiellement, la méthode d'analyse selon l'invention permet l'amplification de séquences de la région d'enveloppe de virus VIH quel que soit leur sous-type et en particulier des virus des sous-types A,B,C,D et E), en utilisant pour l'amplification de l'étape (b) avec une paire d'amorces encadrant une séquence d'acide nucléique susceptible de porter au moins une mutation dans le gène codant pour la protéine d'enveloppe est effectuée avec une paire d'amorces :

FuA : 5'AAGCAATGTATGCCCTCCCAT3' (SEQ ID No: 23) et

FuB : 5' GGTGGTAGCTGAAGAGGCACAGG3' (SEQ ID
No: 24)

suivie d'une deuxième étape d'amplification,
effectuée avec l'amorce :

5 FuC : 5'ATATGAGGGACAATTGGAGAAGTGA3' (SEQ ID
No: 25)

et un mélange des amorces suivantes :

FuD1 :5'TCTGTCTCTCTCTCCACCTTCTTCTT3' (SEQ ID
No: 26)

10 FuD2 :5'TCTGTCTTGCTCTCCACCTTCTTCTT3' (SEQ ID
No: 27) ,

ledit mélange étant préférentiellement
effectué dans un rapport compris entre (10% :90%) et
(90% :10%) et tout préférentiellement entre (60% :40%) et
15 (40% :60%),

pour obtenir un segment d'ADN de 805 paires
de bases s'étendant des résidus 7635 à 8440 inclus et le
vecteur de l'étape (c) est un vecteur retroviral délété
de toute la région codant pour la portion extracellulaire
20 de la sous-unité gp41 de l'enveloppe du VIH-1, s'étendant
des résidus 7745 à 8263 inclus, et comporte un site de
restriction unique Mull.

Avantageusement, l'amplification de l'étape
25 (b) avec une paire d'amorces encadrant une séquence
d'acide nucléique susceptible de porter au moins une
mutation dans le gène codant pour la protéine d'enveloppe
est effectuée avec une paire d'amorces ayant une taille
comprise entre 10 et 50 oligonucléotides, comprenant les
30 séquences : NEU-A : 5'TAGAAAGAGCAGAAGACAGTGGCAATG3' (SEQ
ID No: 17) et FIN-B : 5'TAGCTGAAGAGGCACAGG3' (SEQ ID No:
14) ou FuB : 5' GGTGGTAGCTGAAGAGGCACAGG3' (SEQ ID No: 24)
ou constitués par des fragments de celles-ci, ou encore

par des séquences analogues de celles-ci portant des mutations d'un ou plusieurs nucléotides qui ne modifient pas de manière essentielle leur capacité à hybrider la région du gène de l'enveloppe portant au moins une mutation, suivie d'une deuxième étape d'amplification, avec la paire d'amorces ayant une taille comprise entre 10 et 50 oligonucléotides, comprenant les séquences :
NEU-C : 5'GTGGGTCACAGTCTATTATGGGG3' (SEQ ID No: 18) et
FIN-D : 5'TCCACCTTCTTCTTCGATT3' (SEQ ID No: 16) ou un mélange des séquences suivantes :
FuD1 : 5'TCTGTCTCTCTCTCCACCTTCTTCTT3' (SEQ ID No: 26) et
FuD2 : 5'TCTGTCTTGGCTCTCCACCTTCTTCTT3' (SEQ ID No: 27), ou constitués par des fragments de celles-ci, ou encore par des séquences analogues de celles-ci portant des mutations d'un ou plusieurs nucléotides qui ne modifient pas de manière essentielle leur capacité à hybrider la région du gène de l'enveloppe portant au moins une mutation.

Tout préférentiellement, l'amplification de l'étape (b) avec une paire d'amorces encadrant une séquence d'acide nucléique susceptible de porter au moins une mutation dans le gène codant pour la protéine d'enveloppe est effectuée avec une paire d'amorces :

NEU-A : 5'TAGAAAGAGCAGAAGACAGTGGCAATG3' (SEQ ID No: 17) et

FIN-B : 5'TAGCTGAAGAGGCACAGG3' (SEQ ID No: 14), suivie d'une deuxième étape d'amplification, avec la paire d'amorces:

NEU-C : 5'GTGGGTCACAGTCTATTATGGGG3' (SEQ ID No: 18) et

FIN-D : 5'TCCACCTTCTTCTTCGATT3' (SEQ ID No: 16),

pour obtenir un fragment d'ADN compris entre 2106 et 2320 paires de bases s'étendant des résidus 6197-6222 jusqu'aux résidus 6197-6222 inclus et le vecteur de l'étape (c) est un vecteur retroviral délété de toute la région codant pour la majorité de la sous-unité gp120 et de la portion extracellulaire de la gp41 de l'enveloppe du VIH-1, s'étendant des résidus 6480 à 8263 inclus, et comporte un site de restriction unique Mull.

Tout préférentiellement, l'amplification de l'étape (b) avec une paire d'amorces encadrant une séquence d'acide nucléique susceptible de porter au moins une mutation dans le gène codant pour la protéine d'enveloppe est effectuée avec une paire d'amorces :

NEU-A : 5'TAGAAAGAGCAGAAGACAGTGGCAATG3' (SEQ ID No: 17) et

FuB : 5' GGTGGTAGCTGAAGAGGCACAGG3' (SEQ ID No: 24), suivie d'une deuxième étape d'amplification, avec les amorces:

NEU-C : 5'GTGGGTCACAGTCTATTATGGGG3' (SEQ ID No: 18) et un mélange des amorces suivantes

FuD1 : 5'TCTGTCTCTCTCTCCACCTTCTTCTT3' (SEQ ID No: 26) et

FuD2 : 5'TCTGTCTTGCTCTCCACCTTCTTCTT3' (SEQ ID No: 27),

ledit mélange étant préférentiellement effectué dans un rapport compris entre (10% :90%) et (90% :10%) et tout préférentiellement entre (60% :40%) et (40% :60%),

pour obtenir un fragment d'ADN de 2118 paires de bases s'étendant des résidus 6322 à 8440 inclus et le vecteur de l'étape (c) est un vecteur retroviral délété de toute la région codant pour la majorité de la sous-

unité gp120 et de la portion extracellulaire de la gp41 de l'enveloppe du VIH-1, s'étendant des résidus 6480 à 8263 inclus, et comporte un site de restriction unique M11.

5

Avantageusement, l'amplification de l'étape (b) avec une paire d'amorces encadrant une séquence d'acide nucléique susceptible de porter au moins une mutation dans le gène codant pour la protéine d'enveloppe est effectuée avec une paire d'amorces ayant une taille comprise entre 10 et 50 oligonucléotides, comprenant les séquences : E00 : 5'TAGAAAGAGCAGAAGACAGTGGCAATGA3' (SEQ ID No: 19) et ES8B : 5'CACTTCTCCAATTGTCCCTCA3' (SEQ ID No: 20), ou constitués par des fragments de celles-ci, ou encore par des séquences analogues de celles-ci portant des mutations d'un ou plusieurs nucléotides qui ne modifient pas de manière essentielle leur capacité à hybrider la région du gène de l'enveloppe portant au moins une mutation, suivie d'une deuxième étape d'amplification, avec une paire d'amorces ayant une taille comprise entre 10 et 50 oligonucléotides comprenant les séquences : E20: 5'GGGCCACACATGCCTGTGTACCCACAG3' (SEQ ID No: 21) et E115 : 5'AGAAAAATTCCCCTCCACAATTAA3' (SEQ ID No: 22), ou encore par des séquences analogues de celles-ci portant des mutations d'un ou plusieurs nucléotides qui ne modifient pas de manière essentielle leur capacité à hybrider la région du gène de la protéase portant au moins une mutation.

30

Tout préférentiellement, l'amplification de l'étape (b) avec une paire d'amorces encadrant une séquence d'acide nucléique susceptible de porter au moins

une mutation dans le gène codant pour la protéine d'enveloppe est effectuée avec une paire d'amorces :

E00 : 5'TAGAAAGAGCAGAAGACAGTGGCAATGA3' (SEQ

ID No: 19) et

ES8B : 5'CACTTCTCCAATTGTCCCTCA3' (SEQ ID No:

20),

suivie d'une deuxième étape d'amplification, avec la paire d'amorces:

E20: 5'GGGCCACACATGCCTGTGTACCCACAG3' (SEQ ID

No: 21) et

E115 : 5'AGAAAAATTCCCCTCCACAATTAA3' (SEQ ID

No: 22),

pour obtenir un segment d'ADN de 938 paires de bases s'étendant des résidus 6426 à 7364 inclus et le vecteur de l'étape (c) est un vecteur retroviral délété de la région, codant pour les domaines allant de la boucle V1 à la boucle V3 de l'enveloppe du VIH-1 s'étendant de 6617 à 7250 inclus et comporte un site de restriction unique NheI.

L'invention concerne également une méthode d'analyse pour déterminer la susceptibilité d'un virus VIH à un composé inhibiteur de fusion ciblant la protéine gp41 du VIH-1, consistant à effectuer l'amplification de l'étape (b) soit avec la paire d'amorces SEQ ID No : 13 , SEQ ID No : 14 suivie d'une deuxième amplification avec la paire d'amorces SEQ ID No : 15 SEQ ID No : 16, soit avec la paire d'amorces SEQ ID No : 17 SEQ ID No : 18 suivie d'une deuxième amplification avec la paire d'amorces SEQ ID No : 18 , SEQ ID No : 16, à ajouter ou non ledit composé inhibiteur de fusion, éventuellement à des concentrations différentes, durant la culture de l'hôte cellulaire obtenu à l'étape (e), avant l'étape (f)

et comprenant à l'étape (g) la comparaison de l'expression du gène marqueur avec et sans composé inhibiteur de fusion ciblant la gp41 du VIH-1.

5 L'invention concerne également une méthode d'analyse pour déterminer la susceptibilité d'un virus VIH à un composé inhibiteur d'entrée dudit virus VIH dans une cellule cible, consistant à effectuer l'amplification de l'étape (b) avec la paire d'amorces SEQ ID No : 17 et
10 SEQ ID No : 18 suivie d'une deuxième amplification avec la paire d'amorces SEQ ID No : 18 et SEQ ID No : 16, à ajouter ou non ledit composé inhibiteur d'entrée, éventuellement à des concentrations différentes, à l'hôte cellulaire obtenu à l'étape (e) avant l'infection de
15 l'étape (f) et comprenant à l'étape (g) la comparaison de l'expression du gène marqueur avec et sans composé inhibiteur d'entrée.

L'invention concerne également une méthode
20 d'analyse pour déterminer la susceptibilité d'un virus VIH à l'action inhibitrice des anticorps, consistant à effectuer l'amplification de l'étape (b) avec la paire d'amorces SEQ ID No : 17 SEQ ID No : 18 suivie d'une deuxième amplification avec la paire d'amorces SEQ ID
25 No : 18 , SEQ ID No : 16, à ajouter ou non lesdits anticorps durant l'étape (e) de culture, éventuellement à des concentrations différentes et comprenant à l'étape (g) la comparaison de l'expression du gène marqueur avec et sans anticorps.

30

L'invention concerne également une méthode d'analyse pour déterminer le tropisme d'un virus VIH pour un récepteur cellulaire, consistant à effectuer

l'amplification de l'étape (b) avec la paire d'amorces
SEQ ID No : 17 SEQ ID No : 18 suivie d'une deuxième
amplification avec la paire d'amorces SEQ ID No : 18 ,
SEQ ID No : 16, à effectuer l'infection de l'étape (f)
5 avec les particules virales obtenues à l'étape (e) sur
deux hôtes cellulaires distincts et comprenant à l'étape
(g) la comparaison de l'expression du gène marqueur par
chacun des deux hôtes cellulaires distincts.

10 Avantageusement les hôtes cellulaires
utilisés pour l'infection de l'étape (f) selon la méthode
d'analyse de l'invention sont choisis parmi des hôtes
cellulaires exprimant le récepteur CCR5 ou le récepteur
CXCR4.

15 L'invention concerne également une méthode
d'analyse pour déterminer la susceptibilité d'un virus
VIH à un composé inhibiteur ciblant les corécepteurs du
VIH-1, consistant à effectuer l'amplification de l'étape
20 (b) avec la paire d'amorces SEQ ID No : 17 SEQ ID No : 18
suivie d'une deuxième amplification avec la paire
d'amorces SEQ ID No : 18 , SEQ ID No : 16, à ajouter ou
non ledit composé inhibiteur ciblant les corécepteurs du
VIH-1, éventuellement à des concentrations différentes,
25 durant l'étape (e) de culture, l'infection de l'étape (f)
étant effectuée sur deux hôtes cellulaires distincts et
comprenant à l'étape (g) la comparaison de l'expression
du gène marqueur par chacun des deux hôtes cellulaires
distincts.

30 L'invention concerne également une méthode
d'analyse pour déterminer le tropisme d'un virus VIH pour
un récepteur cellulaire, consistant à effectuer

l'amplification de l'étape (b) avec la paire d'amorces
SEQ ID No : 19 et SEQ ID No : 20, suivie d'une deuxième
amplification avec la paire d'amorces SEQ ID No : 21 et
SEQ ID No : 22, à infecter à l'étape (f) deux hôtes
5 cellulaires distincts avec les particules virales
obtenues à l'étape (e) et comprenant à l'étape (g) la
comparaison de l'expression du gène marqueur par chacun
des deux hôtes cellulaires distincts.

10 L'invention concerne également une méthode
d'analyse pour déterminer la susceptibilité d'un virus
VIH à un composé inhibiteur ciblant les corécepteurs du
VIH-1, consistant à effectuer l'amplification de l'étape
(b) avec la paire d'amorces SEQ ID No : 19 et SEQ ID No :
15 20 suivie d'une deuxième amplification avec la paire
d'amorces SEQ ID No : 21 et SEQ ID No : 22, à ajouter ou
non ledit composé inhibiteur ciblant les corécepteurs du
VIH-1, éventuellement à des concentrations différentes,
durant la culture de l'étape (d), à effectuer l'infection
20 de l'étape (f) avec les particules virales obtenues à
l'étape (e) sur deux hôtes cellulaires distincts et à
comparer à l'étape (g) l'expression du gène marqueur par
chacun des deux hôtes cellulaires distincts.

25 L'invention concerne également une méthode
d'analyse pour déterminer l'infectivité ou la capacité
répliquative d'un virus VIH consistant à comparer à
l'étape (g) l'expression du gène marqueur par le second
hôte cellulaire infecté avec les particules virales
30 obtenues en appliquant les étapes (a) à (f) à un
échantillon biologique d'un patient, et l'expression du
gène marqueur par le même second hôte cellulaire infecté
avec des particules virales de référence obtenues en

appliquant les étapes (a) à (f) à un échantillon contenant un virus de référence.

Avantageusement les particules virales de référence issues d'un virus de référence sont des particules virales obtenues par l'application des étapes (a) à (f) à un échantillon biologique du même patient à un stade préalable du traitement thérapeutique ou avant celui-ci.

L'invention concerne également une méthode d'analyse pour déterminer la virulence d'un virus VIH consistant à effectuer l'amplification de l'étape (b) soit avec la paire d'amorces SEQ ID No : 13 , SEQ ID No : 14 suivie d'une deuxième amplification avec la paire d'amorces SEQ ID No : 15 SEQ ID No : 16, soit avec la paire d'amorces SEQ ID No : 17 SEQ ID No : 18 suivie d'une deuxième amplification avec la paire d'amorces SEQ ID No : 18 , SEQ ID No : 16, et à mesurer, lors de l'infection de l'étape (f), l'effect cytopathogène produit sur le second hôte cellulaire.

Avantageusement l'effet cytopathogène produit lors de l'infection de l'étape (f) sur le second hôte cellulaire est mesuré au moyen des techniques de cytotoxicité telles que la mesure de l'induction de syncytia, de l'induction de l'apoptose ou par cytométrie de flux.

L'invention concerne également une méthode d'analyse pour déterminer la susceptibilité d'un virus VIH à l'hydroxyurée, consistant à ajouter ou non de l'hydroxyurée, éventuellement à des concentrations

différentes, soit durant l'étape (e) de culture, soit au deuxième hôte cellulaire et à effectuer à l'étape (g) la comparaison de l'expression du gène marqueur avec et sans hydroxyurée.

5

De manière préférentielle, la durée de l'étape de culture (e) selon la méthode de l'invention est comprise entre 12 et 72 heures, tout préférentiellement elle est comprise entre 24 et 48 heures.

10

L'invention a également pour objet un kit pour la mise en oeuvre d'une méthode d'analyse d'une caractéristique phénotypique des virus VIH présents dans un échantillon biologique d'un patient caractérisé en ce qu'il comprend :

15

i) une paire d'amorces encadrant une séquence d'acide nucléique du génome viral susceptible de porter au moins une mutation,

20

ii) un vecteur comprenant les parties d'un génome d'un virus VIH nécessaires à la réplication virale à l'exception du segment amplifié avec les amorces définies en (i) et du gène codant pour la protéine d'enveloppe,

25

iii) un second vecteur comprenant un gène codant pour une protéine d'enveloppe,

iv) un premier hôte cellulaire susceptible d'être infecté par un virus VIH,

30

v) un second hôte cellulaire susceptible d'être infecté par un virus VIH et comportant un gène marqueur activable uniquement à la suite de l'infection virale,

vi) les produits et réactifs nécessaires pour réaliser l'amplification par PCR,

vii) les produits et réactifs permettant la détection du marqueur exprimé.

Avantageusement, le kit selon l'invention comprend :

i) les paires d'amorces de séquences :

- SEQ ID No : 1 et SEQ ID No : 2

- SEQ ID No : 3 et SEQ ID No : 4

ii) un vecteur retroviral délété de la région du cadre de lecture pol codant pour la protéase du VIH-1 s'étendant des résidus 1505 à 2565 inclus, délété de la région d'enveloppe et comportant un site unique de restriction MluI,

iii) un virus pseudotypé avec un gène codant pour une protéine d'enveloppe.

iv) un premier hôte cellulaire susceptible d'être infecté par un virus VIH,

v) un second hôte cellulaire susceptible d'être infecté par un virus VIH et comportant un gène marqueur activable uniquement à la suite de l'infection virale,

vi) les produits et réactifs nécessaires pour réaliser l'amplification par PCR,

vii) les produits et réactifs permettant la détection du marqueur exprimé.

Avantageusement le kit selon l'invention comprend :

i) les paires d'amorces de séquences :

- SEQ ID No : 5 et SEQ ID No : 7

- SEQ ID No : 6 et SEQ ID No : 8

ii) un vecteur retroviral délété de la région du cadre de lecture pol codant pour la transcriptase

inverse du VIH-1, s'étendant des résidus 2618 à 2872 inclus, et comportant un site unique de restriction MluI,

iii) un virus pseudotypé par un gène codant pour une protéine d'enveloppe,

5 iv) un premier hôte cellulaire susceptible d'être infecté par un virus VIH,

v) un second hôte cellulaire susceptible d'être infecté par un virus VIH et comportant un gène marqueur activable uniquement à la suite de l'infection virale,

10 vi) les produits et réactifs nécessaires pour réaliser l'amplification par PCR,

vii) les produits et réactifs permettant la détection du marqueur exprimé.

15 Avantageusement le kit selon l'invention comprend :

i) les paires d'amorces de séquences :

20 - SEQ ID No : 9 et SEQ ID No : 10
- SEQ ID No : 11 et SEQ ID No : 12

ii) un vecteur retroviral délété de toute la région du cadre de lecture pol codant pour l'intégrase du VIH-1 s'étendant des résidus 4228 à 5093 inclus et de la région codant pour l'enveloppe virale entre les positions
25 6343 et 7611 incluses,

iii) un virus pseudotypé par un gène codant pour une protéine d'enveloppe,

iv) un premier hôte cellulaire susceptible d'être infecté par un virus VIH,

30 v) un second hôte cellulaire susceptible d'être infecté par un virus VIH et comportant un gène marqueur activable uniquement à la suite de l'infection virale,

vi) les produits et réactifs nécessaires pour réaliser l'amplification par PCR,

vii) les produits et réactifs permettant la détection du marqueur exprimé.

5

Avantageusement le kit selon l'invention comprend :

i) les paires d'amorces de séquences

- SEQ ID No : 13 et SEQ ID No : 14

10

- SEQ ID No : 15 et SEQ ID No : 16

ii) un vecteur retroviral délété de toute la région codant pour la portion extracellulaire de la sous-unité gp41 de l'enveloppe du VIH-1, s'étendant des résidus 7745 à 8263 inclus, et comportant un site de restriction unique Mull,

15

iv) un premier hôte cellulaire susceptible d'être infecté par un virus VIH,

v) un second hôte cellulaire susceptible d'être infecté par un virus VIH et comportant un gène marqueur activable uniquement à la suite de l'infection virale,

20

vi) les produits et réactifs nécessaires pour réaliser l'amplification par PCR,

vii) les produits et réactifs permettant la détection du marqueur exprimé.

25

Avantageusement le kit selon l'invention comprend :

i) les paires d'amorces de séquences

30

- SEQ ID No : 17 et SEQ ID No : 14

- SEQ ID No : 18 et SEQ ID No : 16

ii) un vecteur retroviral délété de toute la région codant pour la majorité de la sous-unité gp120 et

de la portion extracellulaire de la gp41 de l'enveloppe du VIH-1, s'étendant des résidus 6480 à 8263 inclus, et comportant un site de restriction unique Mull,

5 iv) un premier hôte cellulaire susceptible d'être infecté par un virus VIH,

v) un second hôte cellulaire susceptible d'être infecté par un virus VIH et comportant un gène marqueur activable uniquement par des particules virales,

10 vi) les produits et réactifs nécessaires pour réaliser l'amplification par PCR,

vii) les produits et réactifs permettant la détection du marqueur exprimé.

15 Avantageusement le kit selon l'invention comprend :

i) les paires d'amorces de séquences

- SEQ ID No : 19 et SEQ ID No : 20

- SEQ ID No : 21 et SEQ ID No : 22

20 ii) un vecteur retroviral délété de la région, codant pour les domaines allant de la boucle V1 à la boucle V3 de l'enveloppe du VIH-1 s'étendant de 6617 à 7250 inclus et comportant un site de restriction unique NheI,

25 iv) un premier hôte cellulaire susceptible d'être infecté par un virus VIH,

v) un second hôte cellulaire susceptible d'être infecté par un virus VIH et comportant un gène marqueur activable uniquement à la suite de l'infection virale,

30 vi) les produits et réactifs nécessaires pour réaliser l'amplification par PCR,

vii) les produits et réactifs permettant la détection du marqueur exprimé.

Avantageusement le kit selon l'invention comprend :

i) les paires d'amorces de séquences

- 5 - SEQ ID No : 23 et SEQ ID No : 24
 - SEQ ID No : 25 et SEQ ID No : 26 avec SEQ ID No : 27

10 ii) un vecteur retroviral délété de toute la région codant pour la portion extracellulaire de la sous-unité gp41 de l'enveloppe du VIH-1, s'étendant des résidus 7745 à 8263 inclus, et comportant un site de restriction unique Mull,

 iv) un premier hôte cellulaire susceptible d'être infecté par un virus VIH,

15 v) un second hôte cellulaire susceptible d'être infecté par un virus VIH et comportant un gène marqueur activable uniquement à la suite de l'infection virale,

20 vi) les produits et réactifs nécessaires pour réaliser l'amplification par PCR,

 vii) les produits et réactifs permettant la détection du marqueur exprimé.

25 Avantageusement le kit selon l'invention comprend :

i) les paires d'amorces de séquences

- SEQ ID No : 17 et SEQ ID No : 24
 - SEQ ID No : 18 et SEQ ID No : 26 et SEQ ID
30 No : 27

 ii) un vecteur retroviral délété de toute la région codant pour la majorité de la sous-unité gp120 et de la portion extracellulaire de la gp41 de l'enveloppe

du VIH-1, s'étendant des résidus 6480 à 8263 inclus, et comportant un site de restriction unique Mull,

iv) un premier hôte cellulaire susceptible d'être infecté par un virus VIH,

5 v) un second hôte cellulaire susceptible d'être infecté par un virus VIH et comportant un gène marqueur activable uniquement par des particules virales,

vi) les produits et réactifs nécessaires pour réaliser l'amplification par PCR,

10 vii) les produits et réactifs permettant la détection du marqueur exprimé.

D'autres avantages et caractéristiques de l'invention sont illustrés dans les exemples qui suivent
15 et qui font référence aux figures suivantes :

La figure 1 représenté schématiquement le plasmide pSRT. La région codant pour la transcriptase inverse de pNL4-3xcenv est délétée au moyen d'une
20 digestion par *BalI-SnaBI* . La linéarisation du pSRT résultant est accomplie par l'utilisation de *Nru I*.

La figure 2 illustre les courbes des effets dose réponse obtenues pour deux patients versus l'AZT et
25 le 3TC, avant et après le traitement avec des inhibiteurs de la transcriptase inverse.

Les détails du traitement, les prélèvements d'échantillons par rapport au temps et les génotypes se
30 trouvent sur les entêtes des figures.

Les courbes montrent l'inhibition de l'infection par un virus recombinant des cellules P4 traitées soit avec la zidovudine (AZT, panels A et C) ou la lamivudine (3TC, panels B et D), selon la technique

décrite plus loin, dans le paragraphe matériel et méthodes. Pour le patient 1, les échantillons ont été testés à 0 (♦), 9 (•) et 18 (□) mois après le traitement, et pour le patient 2 à 0 (♦) et 27 (•) mois après le traitement.

La figure 3 est un schéma des premières étapes (a et b) d'une mise en oeuvre particulière de la méthode de l'invention. Le schéma illustre les étapes d'extraction (a) et d'amplification (b) des séquences de transcriptase inverse extraites du plasma d'un patient par RT PCR de la méthode de l'invention ainsi que les schémas de constructions du plasmide pRVA/RT utilisé ultérieurement à l'étape (d).

La figure 4 est un schéma des étapes (c) à (g) d'une mise en oeuvre particulière de la méthode de l'invention. Ce schéma illustre l'étape (d) de co-transfection dans des cellules HeLa/293T des acides nucléiques amplifiés de l'étape (b), d'un premier plasmide p43xcsnΔenv RT construit à partir d'un génome d'un virus VIH, ne comprenant pas un segment d'acide nucléique correspondant à tout ou partie de la séquence d'acide nucléique amplifiée à l'étape (b) ni un fragment de la séquence d'acide nucléique codant pour la protéine d'enveloppe et un deuxième plasmide pVSV-G comportant la séquence codant pour la protéine d'enveloppe; l'étape (e) de culture permettant de produire des particules virale, l'étape (f) de transfection des particules virales obtenues à l'étape (e) dans des cellules P4, préalablement incubées en présence ou non de dilutions sériées de différents inhibiteurs de la transcriptase inverse, lesdites cellules indicatrices P4 comportant un

système d'expression du gène codant pour l'enzyme beta-galactosidase activable exclusivement par les séquences d'activation tat exprimées par le virus recombinant, et l'étape (g) de détection et/ou quantification de la beta-galactosidase au moyen du substrat CPRG.

La figure 5 illustre les résultats de l'analyse phénotypique obtenus en présence de l'inhibiteur de fusion T20 pour des virus présents dans des plasmas de patients (P1, P2 et P3) et des prototypes viraux de référence (NL 43 et le clone résistant DIM).

La figure 6 illustre les résultats de mesure de la capacité replicative de virus L1, L2 et L3 extraits de différents échantillons.

I- Matériel et méthodes

I.1 - Amplification par réaction de polymérisation en chaîne (PCR).

L'ARN est isolé à partir du plasma des patients au moyen d'une trousse Roche Amplicor® (Roche Diagnostics, 38242 Meylan Cedex, France), et les gènes d'intérêt sont isolés au moyen d'une transcriptase inverse et une réaction PCR subséquente.

L'amplification de la région codant pour la transcriptase inverse (RT) est effectuée au moyen des amorces externes MJ3 (5' AGT AGG ACC TAC ACC TGT CA 3') (Séquence SEQ ID No : 5 , en annexe) et RT-EXT (5' TTC CCA ATG CAT ATT GTG AG 3') (Séquence SEQ ID No : 6, en annexe) et des amorces internes A35 (5' TTG GTT GCA TAA ATT TTC CCA TTA GTC CTA TT 3') (Séquence SEQ ID No : 7 ,

en annexe) et RT-IN (5' TTC CCA ATG CAT ATT GTG AG 3')
(Séquence SEQ ID No : 8, en annexe) avec un cycle initial
à 50°C (30 minutes) et à 94°C (2 minutes), suivi de 40
cycles à 94°C (30 secondes), 55°C (30 secondes) et 68°C
5 (90 secondes) et une étape finale d'extension à 98°C
durant 10 minutes. Ceci amplifie un produit de 1530 pb
qui s'étend au-delà du codon 93 de la région codant de la
protéase et au-delà du codon 503 de la région codant de
la polymérase (pol).

10 Les produits ainsi obtenus par PCR sont
purifiés sur des colonnes QuiaAmp® et analysés en ce qui
concerne leur taille, leur degré de pureté et leur
concentration approximative par électrophorèse sur des
gels d'agarose.

15

I.2 - Génotypage

Les séquences de nucléotides des régions
codantes de la transcriptase inverse sont déterminées par
séquençage automatique de la terminaison de la chaîne
20 didéoxinucléotidique des produits de PCR bruts.

I.3 - Plasmides

Les clones moléculaires du VIH-1 utilisés
dans la méthode d'analyse dérivent de pNL4-3.

25

Le plasmide délété en transcriptase inverse
est construit par une modification du pNL4-3xcΔenv muté
pour porter des sites de restriction *SnaBI* uniques dans
la position 3872 et de *Nru I* dans la position 3892.

30

Les enzymes *Ba I* et *SnaB I* sont utilisées
pour retirer la région codant pour la transcriptase
inverse (entre les positions 2618 et 2872) et la
linéarisation du plasmide résultant pSRT est effectuée

au moyen de l'enzyme Nru I. L'expression de la glycoprotéine d'enveloppe VSV-G dans les cellules transfectées est assuré par le plasmide pVSV qui contient la séquence codante vsv-g sous le contrôle d'un promoteur CMV.

I.4 - Cultures cellulaires.

Des cellules HeLa, 293 T et P4 sont cultivées dans du milieu DMEM supplémenté avec 10% de sérum de veau fœtal (SVF), 50 UI/ml de pénicilline et 50 µg/ml de streptomycine. Les cellules P4 sont des cellules Hela-CD4, LTR-LacZ dans lesquelles l'expression de la beta-galactosidase est strictement inductible par la protéine Tat transactivateur du VIH, permettant par conséquent, une quantification précise de l'infectivité ou de la capacité répliquative des virus VIH-I basée sur un cycle unique de réplication (Charneau, P., Mirambeau, G., Roux, P., Paulous, S., Buc, H. and Clavel, F. (1994) « HIV-1 reverse transcription. A termination step at the center of the genome". J Mol Biol 241(5), 651-62.). Les cellules P4 sont cultivées en présence de 500 µg/ml de geneticine.

II. - Détermination de la susceptibilité d'un virus VIH à un inhibiteur de Transcription inverse (RTI).

La détermination de la susceptibilité d'un virus VIH à un inhibiteur de transcriptase inverse est effectuée de la manière suivante: des cellules 293 T sont transfectées avec 7,5 µg de plasmide pSRT linéarisé par NruI, 0,1 µg du plasmide pVSV-G et 0,5 et 1 µg du produit issu de la réaction PCR de la transcription inverse de VIH. Le précipité de transfection est retiré des cellules après 18 heures d'incubation et du milieu de croissance

frais est ajouté. Après 24 heures de culture, le surnageant est clarifié par centrifugation (500 g, 15 minutes) et transféré sur des cellules indicatrices P4 lesquelles ont été pré-incubées avec des dilutions
5 sèriées d'un inhibiteur de la transcriptase inverse, dans de puits triplicatas, durant quatre heures. La gamme de concentrations d'inhibiteur utilisée varie selon les composés. Le signal produit par l'activation du gène marqueur a été développé avec du CPRG durant 48 heures,
10 comme pour l'analyse de la susceptibilité à un inhibiteur de transcriptase inverse et l'indice IC₅₀ a été calculé en utilisant l'équation d'effet médian.

III - Optimisation de la méthode d'analyse
15 pour déterminer la susceptibilité d'un virus VIH aux
inhibiteurs de transcriptase inverse.

Le plasmide pSRT portant une délétion dans la région codant pour pol allant du codon 24 de la
20 transcriptase inverse (base 2618) au codon 432 de la transcriptase inverse (base 3872) inclut toutes les mutations associées à un phénomène de résistance connus à ce jour. Les séquences homologues du produit transcriptase inverse issu de PCR s'étendent 88 paires de
25 base en amont et 186 bases en aval de la délétion dans pSRT. Les transfections pour la détermination de la susceptibilité aux inhibiteurs de la transcriptase inverse sont effectuées avec une lignée cellulaire 293T ayant une forte capacité à être transfectée plutôt
30 qu'avec des cellules HeLa. Ceci ne constitue pas un problème car les cellules sont éliminées du surnagent contenant le virus par centrifugation avant le transfert de cellules P4.

Les conditions de transfert sont optimisées au moyen d'un test en échiquier. La variation du ratio du plasmide/produit issu de PCR ne modifie significativement la quantité de p24 ou de transcriptase inverse produites ou la vitesse de réaction avec CPRG. Etant donné que le plasmide circulaire, pVSV-G semble être extrêmement toxique pour les cellules 293T, la quantité de celui-ci a été réduite de 3 μg à 0,1 μg dans le mélange de transfection, conduisant à des rendements élevés en p24 (>20 ng/ml comparé à 9,8 ng/ml).

Etant donné que les phases précoces de la réplication du virus, incluant la transcription inverse, se produisent dans les cellules P4 indicatrices dans ce type de détermination, ce sont ces cellules qui sont traitées avec des dilutions en série des inhibiteurs de la transcriptase inverse.

Les gammes de concentration d'inhibiteur utilisées sont choisies en fonction de la toxicité cellulaire de chaque composé et du ratio $\text{IC}_{50}/\text{IC}_{90}$ pour la susceptibilité des isolats résistants (Tableau 1). Par exemple, comme l'indice IC_{50} pour l'abacavir pour les cellules P4 est d'environ 250 μM alors que l'indice IC_{50} pour ce composé pour la souche native du virus est d'environ 3 μM , la détection de la résistance est limitée par la toxicité. Une gamme de quatre dilutions en série, commençant à 200 μM a été utilisée pour l'abacavir, permettant la détection de jusqu'à 60 fois plus de résistance.

D'autre part, puisque la toxicité de l'AZT pour les cellules P4 est élevée (>300 μM) alors que

l'indice IC_{50} est considérablement inférieur, une gamme plus large de dilutions a été utilisée (dilution en série 1/10 à partir de 5 μM) de manière à permettre la détection de niveaux élevés de résistance (jusqu'à 100 fois).

Pour la transcriptase inverse RVA, l'indice IC_{50} est utilisé plutôt que l'indice IC_{90} car la détection de l'indice IC_{90} pour les virus résistants pourrait demander des niveaux de composé toxiques pour la plupart d'inhibiteurs de transcriptase inverse.

TABLEAU 1 : Susceptibilité du virus de référence NL4-3 aux inhibiteurs de transcriptase inverse (RTI).

Inhibiteurs de RT	Concentrations en drogues utilisées		Moyenne géométrique IC ₅₀ ^a	Déviation standard ^a	Susceptibilité détectable maximum ^b
	Gammes / Etapes de dilution				
AZT	50 µM - 5 nM	10 x	0,018 µM	2,7	2700
3TC	200 - 0,02 µM	10 x	1,512 µM	2,2	130
D4T	100 - 0,01 µM	10 x	0,444 µM	2,7	220
DDI	100 - 0,01 µM	10 x	1,613 µM	2,5	60
Abacavir	200 - 0,8 µM	4 x	2,229 µM	1,8	90
Effavirenz	100 - 0,16 nM	5 x	0,716 nM	2,2	140
Nevirapine	50 µM - 5 nM	10 x	0,037 µM	2,0	1300

a- moyenne géométrique et déviation standard de 20 tests répétés pour les inhibiteurs de transcriptase inverse.

b- différence maximale approximative pour les indices IC₅₀ et IC₉₀ entre NL43 et le virus testé qui peut être mesurée en utilisant la gamme de concentrations en drogues donnée

La méthode d'analyse pour déterminer la susceptibilité du virus VIH aux inhibiteurs de transcriptase inverse donne une Déviation Standard de la moyenne géométrique pour 20 tests entre 1,78 (abacavir) et 2,7 (D4T et AZT). La déviation standard médiane pour les inhibiteurs de la transcriptase inverse (RTI) essayés (AZT, 3TC, D4T, DDI, abacavir, efavirenz et nevirapine) est de 2,2. De manière à simplifier l'interprétation automatique des résultats des échantillons des patients, une valeur Index de Résistance (IR) arbitraire, IR = 5 a été défini comme le minimum de réduction de la susceptibilité à un RTI considéré comme étant significativement réduit par rapport à NL43.

Pour déterminer si NL43 est un virus de référence convenable pour la comparaison avec les isolats cliniques, un panel d'échantillons pris de patients avec un traitement banal a été essayé sur 3 réplicats RVA pour leur susceptibilité aux inhibiteurs de transcriptase inverse.

l'IC₅₀ médian trouvé pour 22 virus testés tend à être légèrement supérieur à celui trouvé pour le virus NL43 avec un IR médian aux alentours de 0,92 (pour stavudine) et de 1,22 (lamivudine). Bien que l'IR soit inférieur à la limite définie de 5 sur le total d'inhibiteurs pour la plupart d'échantillons testés, la gamme d'IR semble large, en particulier pour les inhibiteurs non-nucléosides. En particulier, un indice de résistance de 11,0 pour la nevirapine a été obtenu pour un virus or, ce virus portait une mutation sur le codon 98 (A pour S) de la transcriptase inverse, qui avait été précédemment impliqué dans la résistance aux NNRTIs.

IV - Reproductibilité

La reproductibilité de la méthode de détermination de la susceptibilité du virus recombinant (RVA) aux inhibiteurs de transcriptase inverse (RTI) a été évaluée par une série de tests sur 5 échantillons, choisis de manière à représenter une large gamme de profils de susceptibilité, entre 4 et 8 tests par échantillon, en utilisant des préparations d'ARN et des réactions PCR séparées.

La variation inter-test pour la détermination de la susceptibilité des virus VIH aux inhibiteurs de la transcriptase inverse indique que dans quelques cas il existe une différence supérieure à 5 entre l'IR maximum et l'IR minimum trouvés pour des déterminations répétées (Tableau 2), cependant, la déviation standard de la moyenne géométrique est maintenue = 2,2 dans tous les cas sauf un (R4, AZT). Dans trois des échantillons l'IR obtenu lors des tests répétés varie entre <5 et >5 pour les composés pour lesquels les virus peuvent être modérément résistants (IR non supérieur à 12).

TABLEAU 2 : Reproductibilité de la susceptibilité aux RTI.

Echantillon (Nombre de tests)	Génotype ^a	Index de Résistance ^b									
		AZT	3TC	D4T	DDI	Abacavir	Efavirenz	Nevirapine			
R1 (6)	69N/T, 70R	MG ^c SD ^d max/min ^e n>4/N ^f	1,5 1,5 2,9 0/6	1,3 1,5 2,8 0/6	1,4 1,4 2,2 0/6	1,4 1,6 2,8 0/6	1,1 1,2 1,6 0/6	1,0 1,1 1,2 0/6	2,2 1,8 3,8 0/6		
R2 (6)	41L, 62V, 67N, 69N, 75I, 77L, 115F, 116Y, 151M, 181C, 184V, 190A 208Y, 215F, 219Q	MG ^c SD ^d max/min ^e n>4/N ^f	1232,6 1,6 3,8 6/6	>f na na 6/6	43,5 2,1 8,1 6/6	26,9 1,7 4,1 6/6	> na na 6/6	74,9 1,7 3,9 6/6	> na na 6/6		
R3 (6)	184V, 215F	MG ^c SD ^d max/min ^e n>4/N ^f	13,2 2,7 8,9 5/6	> na na 1/6	3,2 1,8 5,7 1/6	3,1 1,6 3,3 1/6	4,3 1,4 2,4 4/6	1,0 1,0 1,0 0/6	1,2 1,3 1,6 0/6		
R4 (5)	41L, 67N, 69D, 184V, 190A, H208Y, 210W, 215Y	MG ^c SD ^d max/min ^e n>4/N ^f	137,5 1,8 4,5 5/5	> na na 5/5	3,6 2,0 4,1 3/5	3,0 1,3 1,7 5/5	6,1 1,6 3,3 3/5	149,8 1,6 3,9 5/5	> na na 5/5		
R5 (5)	215Y, 41L, 74V, 100I, 103N	MG ^c SD ^d max/min ^e n>4/N ^f	3,3 1,6 3,0 1/5	1,8 1,7 3,7 0/5	1,7 1,8 3,7 0/5	2,6 1,6 2,5 0/5	1,7 1,6 2,9 0/5	> na na 5/5	580,5 1,8 2,2 5/5		

(a) Seules les substitutions en acides aminés déjà connues pour être associées avec une résistance aux inhibiteurs de la transcriptase inverse sont indiquées.

5 (b) L'Index de Résistance est le rapport de l'IC₅₀ dans l'échantillon par rapport à celui de NL43 déterminé en parallèle.

(c) Moyenne géométrique.

(d) Déviation standard de la moyenne géométrique.

10 (e) L'index de résistance le plus élevé obtenu dans les tests divisé par le plus faible.

(f) Le nombre de tests donnant un index de résistance >4 classant le virus comme résistant/ au nombre total de tests réalisés.

15 (g) Un IC₅₀ au-dessus de la gamme détectable dans tous les tests est indiqué par >. Dans ces cas, une déviation standard et un minimum/ maximum ne sont pas applicables (na).

20 Les résultats phénotypiques obtenus pour ces Inhibiteurs de transcriptase inverse montrent une concordance avec les profils génotypiques des échantillons.

25 L'échantillon R2, qui montre un degré élevé de résistance par rapport à tous les composés testés, comporte des mutations multiples en incluant celles du complexe de résistance multi-composé (62V, 75I, 77L, 116Y et 151M) qui confère la résistance aux nucléotides RTI, la résistance 3TC associée à la mutation 184V et des
30 mutations connues pour induire une susceptibilité réduite aux NNRTI (181C, 190A).

L'échantillon R3 montre un niveau de résistance élevé à 3TC, à nouveau modulé par la mutation

184V, avec une variation considérable de l'IR pour AZT qui reflète probablement la nature inconsistante de la suppression de la résistance induite par 215F par 184V.

5 Dans l'échantillon R4, une telle suppression est contrecarrée par la présence de mutations multiples incluant une mutation 208Y.

10 L'échantillon R5 se maintient sensible à AZT malgré une mutation 41L et une mutation 215Y à cause des effets de la mutation 100I qui, en combinaison avec 103N, est responsable des niveaux de résistance élevés observés vis-à-vis d'efavirenz et de nevirapine.

15 V- Validation de la méthode d'analyse pour déterminer la susceptibilité d'un virus VIH aux inhibiteurs de fusion.

Les recombinaisons obtenues en utilisant pour l'amplification de l'étape (b) la paire d'amorces FuA :
20 5'AAGCAATGTATGCCCCCTCCCAT3' (SEQ ID No: 23) et FuB : 5'GGTGGTAGCTGAAGAGGCACAGG3' (SEQ ID No: 24) suivie d'une deuxième amplification, effectuée avec l'amorce : FuC :
5'ATATGAGGGACAATTGGAGAAGTGA3' (SEQ ID No: 25) et un mélange des amorces suivantes :
FuD1 : 5'TCTGTCTCTCTCTCCACCTTCTTCTT3' (SEQ ID No: 26)
25 FuD2 : 5'TCTGTCTTGCTCTCCACCTTCTTCTT3' (SEQ ID No: 27) sont très efficaces.

30 En effet, pour obtenir une production virale satisfaisante il suffit généralement de 10-50 ng de produit de PCR, utilisé dans l'étape de recombinaison. Dans cette méthode destinée à analyser la caractéristique phénotypique de fusion, une production virale correspondante à 50-400 ng/ml de p24 est obtenue après

transfection. Pour l'infection des cellules cible, entre 0,5 et 5 ng p24/ puit (plaques 96 puits) sont utilisés. L'augmentation de la densité optique obtenue après infection de cellules cible est linéaire si l'infection est conduite dans ces conditions

Afin de valider la méthode d'analyse concernant la susceptibilité des virus VIH aux inhibiteurs de fusion, deux inhibiteurs de fusion, ont été utilisés: un peptide dérivé de la séquence de l'hélice distale dans la gp41 de VIH (appelé DP178 ou T20) et un dérivé de l'acide bétulinique (RPR103611). Pour chaque inhibiteur, la réduction de sensibilité d'un ou plus virus résistant (précédemment identifié par d'autres auteurs) par rapport à deux virus de référence: un virus plasmatique primaire T5A1 et un virus adapté à la culture in vitro (LAI) a été effectuée. Tous les virus ont été produits par recombinaison.

Résultats

V.1- Inhibiteur DP178 ou T20.

L'augmentation de l'IC50 pour un virus fortement résistant NL-DIM (décrit par Rimsky L.T. et al. J. Virol. 1998, vol 72, pages 986-993) et pour le virus NL4.3 (qui est partiellement résistant) ont été mesurées vis-à-vis de cet inhibiteur.

Le virus fortement résistant DIM présente une augmentation de la valeur de l'IC50 de 80 fois par rapport à T5A1 et de plus de 100 fois par rapport à LAI.

Le virus partiellement résistant NL4.3 est caractérisé par une augmentation de l'IC50 de 10 fois par rapport à T5A1 et de 12,5 fois par rapport à LAI.

V.1.1 Détermination de la susceptibilité d'un
VIH plasmatique à l'inhibiteur de fusion T20

5 L'ARN viral est extrait à partir des plasmas
de patients VIH positifs.

On effectue une première amplification par
PCR avec la paire d'amorces ED3_E01-.

10 On effectue une seconde amplification par PCR
avec la paire d'amorces E10_FuB pour obtenir un fragment
d'ADN de 2200 paires de bases s'étendant entre les
résidus 6322 et 8522.

On effectue la transfection d'un premier hôte
cellulaire avec :

15 - les acides nucléiques obtenus après la
seconde amplification.

- le vecteur retroviral délété de toute la
région codant pour la majorité de la sous-unité gp120 et
de la portion extracellulaire de la gp41 de l'enveloppe du
20 VIH, s'étendant des résidus 6480 à 8263 inclus et
comportant un site de restriction unique MluI.

On met en culture du premier hôte cellulaire
dans des conditions permettant de produire des particules
25 virales.

On effectue l'infection par les particules
virales produites à l'étape précédente, d'un second hôte
cellulaire (comportant un gène marqueur activable suite à
l'infection virale) en présence de dose croissante
30 d'inhibiteur de fusion T20.

On effectue la quantification du marqueur
exprimé afin de mettre en évidence le niveau de

susceptibilité des virus VIH présents dans les échantillons biologiques à l'inhibiteur de fusion T20.

Les résultats de l'analyse phénotypique décrite ci-dessus pour des virus présents dans des plasmas de patients (P1, P2 et P3) et des prototypes viraux de référence (NL 43 et le clone résistant DIM) sont illustrés dans la figure 5 en annexe et les indices IC50 sont représentés dans le tableau 3 ci-dessous.

Tableau 3

Echantillons	IC 50
P1	0,132
P2	0,017
P3	0,047
DIM	> 3
NL 43	0,234

V.2- Inhibiteur RPR103611

L'augmentation de l'IC50 du virus résistant LAI-L91H (Labrosse B. et al. J Virol. 2000 vol 74 pages 2142-2150) vis -à-vis de cet inhibiteur a été mesurée.

Pour le virus LAI-L91H, l'augmentation de l'IC50 par rapport à LAI et à T5A1 est supérieure à 100 fois.

VI- Optimisation de la méthode d'analyse pour déterminer la CAPACITE NEUTRALISANTE des virus VIH

Les recombinaisons obtenues en utilisant pour l'amplification de l'étape (b) une paire d'amorces NEU-

A : 5'TAGAAAGAGCAGAAGACAGTGGCAATG3' (SEQ ID No: 17) et
FuB : 5' GGTGGTAGCTGAAGAGGCACAGG3' (SEQ ID No: 24),
suivie d'une deuxième amplification, avec les amorces:
NEU-C : 5'GTGGGTCACAGTCTATTATGGGG3' (SEQ ID No: 18) et un
5 mélange des amorces FuD1 :5'TCTGTCTCTCTCTCCACCTTCTTCTT3'
(SEQ ID No: 26) et FuD2 :5'TCTGTCTTGCTCTCCACCTTCTTCTT3'
(SEQ ID No: 27) sont également très efficaces.

10 En effet, lors des contrôles de production
virale, il s'est avéré que pour obtenir une production
virale satisfaisante il suffit généralement de 10-50 ng
de produit de PCR, utilisé dans l'étape de recombinaison.

15 Une production virale correspondante à 50-400
ng/ml de p24 après transfection est obtenue. Pour
l'infection des cellules cible, entre 0,5 et 5 ng p24/
puit (plaques 96 puits) sont utilisés. L'augmentation de
la densité optique obtenue après infection de cellules
cible est linéaire si l'infection est conduite dans ces
20 conditions.

VII. Mesure de l'infectivité virale (ou test
de capacité répliquative)

25 On effectue une première amplification par PCR
avec la paire d'amorces FITA et PROA-

30 On effectue une seconde amplification par PCR
avec la paire d'amorces FITB et PROB- pour obtenir un
fragment d'ADN de 1488 paires de bases s'étendant entre
les résidus 1237 et 2725.

On effectue la transfection d'un premier hôte cellulaire avec :

- les acides nucléiques obtenus après la seconde amplification.

5 - le vecteur retroviral délété d'une région codant pour une partie de Gag et la totalité de la protéase et comportant un site de restriction unique MluI.

10 On effectue la culture du premier hôte cellulaire dans des conditions permettant de produire des particules virales.

15 On mesure la quantité de particules virales recombinantes dans le surnageant de cette culture par un test Elisa dosant la quantité d'antigène p24.

20 On effectue l'infection par les particules virales produites à l'étape précédente, d'un second hôte cellulaire (comportant un gène marqueur activable suite à l'infection virale), par des dilutions croissantes du surnageant viral

25 On effectue la quantification du marqueur exprimé afin de mettre en évidence le niveau d'infectivité du virus recombinant

30 On calcule la capacité répliquative du virus recombinant en établissant une droite de régression à partir des valeurs mesurées et en retenant la pente de cette droite.

On exprime la capacité répliquative virale par rapport à celle d'un virus de référence de laboratoire ou

relativement au virus recombinant porteur des séquences virales provenant du même patient avant établissement du traitement et avant développement de la résistance. Les résultats obtenus sont illustrés sur la figure 6 en annexe.

5

Les virus L1, L2 et L3 correspondent à des virus recombinants porteurs de séquences de protéase obtenues à trois moments différents chez un même patient. Le virus L1 porte des séquences de protéase obtenues avant traitement. Chaque point correspond à la densité optique mesurée après infection de cellules indicatrices P4 par une dilution de chacun des 3 virus. On trace une droite de régression pour la série des mesures de chaque virus. On calcule la pente de la droite. On exprime la capacité répliquative de L2 par le rapport de la pente de L2 à celle de L1, et la capacité répliquative de L3 par le rapport de la pente de L3 à celle de L1. Ici le virus de référence est le virus préthérapeutique L1. Lorsque le virus préthérapeutique manque, on peut exprimer la capacité répliquative d'un virus de patient relativement à un virus de référence de laboratoire comme pNL4-3.

10

15

20

REVENDEICATIONS

1) Méthode d'analyse d'une caractéristique
phénotypique des virus VIH présents dans un échantillon
5 biologique d'un patient, ladite caractéristique
phénotypique résultant d'une ou plusieurs mutations du
génome viral susceptibles d'influencer l'infection
virale, caractérisée en ce qu'elle comprend :

10 a) l'extraction des acides nucléiques
contenus dans ledit échantillon biologique,

b) au moins une amplification par PCR d'un
segment des acides nucléiques de l'étape (a), chacune
avec une paire d'amorces encadrant une séquence d'acide
nucléique du génome viral susceptible de porter au moins
15 une mutation,

c) la préparation d'un vecteur comprenant les
parties d'un génome d'un virus VIH nécessaires à la
réplication virale à l'exception du segment amplifié à
l'étape (b) et éventuellement à l'exception du gène
20 codant pour la protéine d'enveloppe,

d) la transfection d'un premier hôte
cellulaire avec :

- les acides nucléiques obtenus à l'étape
(b),

25 - le vecteur préparé à l'étape (c),

- éventuellement un second vecteur comprenant
un gène codant pour une protéine d'enveloppe si le gène
d'enveloppe est délété du vecteur préparé à l'étape (c),

30 pour obtenir par recombinaison homologue un
virus chimérique,

e) la culture dudit premier hôte cellulaire
dans des conditions permettant de produire des particules
virales au cours d'un seul cycle de réplication,

f) l'infection par les particules virales obtenues à l'étape (e) d'au moins un second hôte cellulaire susceptible d'être infecté par un virus VIH ou un virus pseudotypé VIH et comportant éventuellement un gène marqueur activable uniquement à la suite de l'infection virale,

g) la détection et/ou la quantification du marqueur exprimé à l'étape (f) afin de mettre en évidence au moins une caractéristique des virus VIH présents dans l'échantillon biologique.

2) Méthode d'analyse selon la revendication 1 caractérisée en ce que l'amplification par PCR de l'étape (b) est réalisée avec une paire d'amorces encadrant une séquence d'acide nucléique comprenant tout ou partie d'une région du génome virale choisie parmi: gag, pol, protéase, transcriptase inverse, RNase H, intégrase, vif, vpr, tat, rev, vpu, env, nef, séquences cis-actives, LTR, séquences de dimérisation, séquences régulatrices de l'épissage ou élément de réponse de Rev (RRE).

3) Méthode d'analyse selon l'une quelconque des revendications 1 ou 2, caractérisée en ce que l'amplification par PCR de l'étape (b) est réalisée avec une paire d'amorces encadrant une séquence d'acide nucléique codant pour une partie de la protéine gag du virus de l'immunodéficience humain et une séquence d'acide nucléique codant pour la protéase, susceptible de porter au moins une mutation dans le gène codant pour la protéase et, en ce que le vecteur de l'étape (c) est construit à partir d'un génome d'un virus VIH où tout ou partie du gène codant pour la protéase est délété.

4) Méthode d'analyse selon les revendications 1 à 3 caractérisée en ce que l'amplification de l'étape (b) portant au moins une mutation dans le gène codant pour la protéase est effectuée avec une paire d'amorces :

Fit A - : (5' TCA CCT AGA ACT TTA AAT GC 3')

(SEQ ID No : 1) et

Pro A- : (5' GGC AAA TAC TGG AGT ATT GTA TG3' 3') (SEQ ID No : 2),

suivie d'une deuxième amplification avec une paire d'amorces :

Fit B : (5' AGA ACT TTA AAT GCA TGG GT 3')

(SEQ ID No : 3) et

Pro B- : (5' GGA GTA TTG TAT GGA TTT TCA GG 3') (SEQ ID No : 4),

pour obtenir un segment d'ADN de 1488 paires de bases, s'étendant entre les résidus 1237 et 2725 inclus, et

en ce que le vecteur de l'étape (c) est un vecteur retroviral délété de la région du cadre de lecture pol codant pour la protéase du VIH-1 s'étendant des résidus 1505 à 2565 inclus, délété de la région d'enveloppe et comportant un site unique de restriction MluI.

5) Méthode d'analyse selon les revendications 1 ou 2 caractérisée en ce que l'amplification par PCR de l'étape (b) est réalisée avec une paire d'amorces encadrant une séquence d'acide nucléique susceptible de porter au moins une mutation dans le gène codant pour la transcriptase inverse, et la transfection de l'étape (c) est réalisée avec un premier vecteur construit à partir

d'un génome d'un virus VIH où tout ou partie du gène codant pour la transcriptase inverse est délété.

5 6) Méthode d'analyse selon la revendication 1, 2 ou 5, caractérisée en ce que l'amplification de l'étape (b) est effectuée avec une paire d'amorces :

MJ3 (5' AGT AGG ACC TAC ACC TGT CA 3') (SEQ ID No : 5) et

10 RT-EXT (5' TTC CCA ATG CAT ATT GTG AG 3') (SEQ ID No : 6),

suivie d'une deuxième étape d'amplification avec une paire d'amorces :

A35 (5' TTG GTT GCA TAA ATT TTC CCA TTA GTC CTA TT 3') (SEQ ID No : 7) et

15 RT-IN (5' TTC CCA ATG CAT ATT GTG AG 3') (SEQ ID No : 8)

20 pour obtenir un segment d'ADN de 1530 paires de bases s'étendant au delà du codon 93 de la région codant pour la protéase et au delà du codon 503 de la région codant pour la polymérase (POL) et

25 en ce que le vecteur de l'étape (c) est un vecteur retroviral délété de la région du cadre de lecture pol codant pour la transcriptase inverse du VIH-1, s'étendant des résidus 2618 à 2872 inclus, et comportant un site unique de restriction MluI.

30 7) Méthode d'analyse selon la revendication 1, ou 2, caractérisée en ce que l'amplification de l'étape (b) est effectuée avec une paire d'amorces encadrant une séquence d'acide nucléique codant pour une partie de la protéine gag, pour la protéase et pour une partie de la transcriptase inverse du virus de l'immunodéficience humaine susceptible de porter au moins

une mutation dans la séquence d'acide nucléique codant pour la protéine gag, ou pour la protéase ou pour la transcriptase inverse.

5 8) Méthode d'analyse selon la revendication 1, 2 ou 7 caractérisée en ce que l'amplification de l'étape (b) est effectuée avec la paire d'amorces :

 gag+1 (5' AGGGGCAAATGGTACATCA 3') (SEQ ID No : 31) et

10 RT-EX (SEQ ID n° 6),

 suivie d'une deuxième étape d'amplification avec une paire d'amorces :

 Fit B+ (SEQ ID No : 1) et

 RT-IN (SEQ ID No : 8)

15 pour obtenir un segment d'ADN de 2825 paires de bases, s'étendant entre les résidus 1237 et 4062 et

 en ce que la transfection de l'étape (c) est réalisée avec un vecteur rétroviral délété d'une partie du gène gag et des régions du cadre de lecture pol codant pour la protéase et une partie de la transcriptase inverse du VIH-1 s'étendant des résidus 1507 à 3870 inclus, délété dans la région d'enveloppe et comportant un site unique de restriction NruI.

25 9) Méthode d'analyse selon les revendications 1, 2, 5 ou 6 consistant à déterminer la susceptibilité d'un virus VIH à un composé inhibiteur de la transcriptase inverse, caractérisée en ce que l'on ajoute ou non ledit composé inhibiteur de la transcriptase inverse, éventuellement à des concentrations différentes, au deuxième hôte cellulaire, préalablement à l'infection de celui-ci par les particules virales obtenues à l'étape (e), et en ce que l'étape (g) comprend la comparaison de

30

l'expression du gène marqueur avec et sans composé inhibiteur de la transcriptase inverse

5 10) Méthode d'analyse selon les revendications 1 ou 2, caractérisée en ce que l'amplification par PCR de l'étape (b) est réalisée avec une paire d'amorces encadrant une séquence d'acide nucléique susceptible de porter au moins une mutation dans le gène codant pour l'intégrase, et le vecteur de 10 l'étape (c) est un vecteur retroviral délété de tout ou partie du gène codant pour l'intégrase.

11) Méthode d'analyse selon les revendication 1, 2 ou 10, caractérisée en ce que l'amplification de 15 l'étape (b) est effectuée avec la paire d'amorces :

INT B+ -5'GTTACTAATAGAGGAAGACAAA3' (SEQ ID

No: 9) et

INT B- 5'TTTTGGTGTATTATGCT3' (SEQ ID No:

10),

20 suivie d'une deuxième étape d'amplification, avec la paire d'amorces :

INT V+ 5'CACCCTAACTGACACAACAA3' (SEQ ID No:

11) et

INT V- 5'AAGGCCTTCTTATAGCAGA3' (SEQ ID No:

25 12),

pour obtenir un fragment d'ADN de 1460 paires de bases s'étendant des résidus 3950 à 5410 inclus et

30 en ce que le vecteur de l'étape (c) est un vecteur retroviral délété de toute la région du cadre de lecture pol codant pour l'intégrase du VIH-1 s'étendant des résidus 4228 à 5093 inclus et de la région codant pour l'enveloppe virale entre les positions 6343 et 7611 incluses.

12) Méthode d'analyse selon les revendications 1, 2, 10 ou 11 consistant à déterminer la susceptibilité d'un virus VIH à un composé inhibiteur de l'intégrase, caractérisée en ce que l'on ajoute ledit composé inhibiteur de l'intégrase, éventuellement à des concentrations différentes, durant l'étape (e), avant l'étape (f) et en ce que l'étape (g) comprend la comparaison de l'expression du gène marqueur avec et sans composé inhibiteur de l'intégrase.

13) Méthode d'analyse selon les revendications 1 ou 2, caractérisée en ce que l'amplification par PCR de l'étape (b) est réalisée avec une paire d'amorces encadrant une séquence d'acide nucléique susceptible de porter au moins une mutation dans le gène codant pour la protéine d'enveloppe, et en ce que le vecteur de l'étape (c) est un vecteur retroviral construit à partir d'un génome d'un virus VIH où tout ou partie du gène codant pour la protéine d'enveloppe est délété.

14) Méthode d'analyse selon les revendications 1, 2 ou 13 caractérisée en ce que le vecteur de l'étape (c) est un vecteur retroviral délété de toute la région codant pour la portion extracellulaire de la sous-unité gp41 de l'enveloppe du VIH-1, s'étendant des résidus 7745 à 8263 inclus, de la région du génome VIH-1 constitutrice de l'élément de réponse à Rev (RRE).

15) Méthode d'analyse selon les revendications 1, 2, 13 ou 14, caractérisée en ce que

l'amplification de l'étape (b) est effectuée avec une paire d'amorces :

FIN-A : 5'TCAAATATTACAGGGCTGCT3' (SEQ ID No: 13) et

5 FIN-B : 5'TAGCTGAAGAGGCACAGG3' (SEQ ID No: 14) suivie d'une deuxième étape d'amplification, effectuée avec la paire d'amorces :

FIN-C : 5'CTATTAACAAGAGATGGTGG3' (SEQ ID No: 15) et

10 FIN-D : 5'TCCACCTTCTTCTTCGATT3' (SEQ ID No: 16),

pour obtenir un segment d'ADN de 965 paires de bases s'étendant des résidus 7553 à 8517 inclus et

15 en ce que le vecteur de l'étape (c) est un vecteur retroviral délété de toute la région codant pour la portion extracellulaire de la sous-unité gp41 de l'enveloppe du VIH-1, s'étendant des résidus 7745 à 8263 inclus, et comporte un site de restriction unique Mull.

20 16) Méthode d'analyse selon les revendications 1, 2, 13 ou 14 caractérisé en ce que l'amplification de l'étape (b) avec une paire d'amorces encadrant une séquence d'acide nucléique susceptible de porter au moins une mutation dans le gène codant pour la
25 protéine d'enveloppe est effectuée avec une paire d'amorces :

FuA : 5'AAGCAATGTATGCCCCCTCCCAT3' (SEQ ID No: 23) et

30 FuB : 5' GGTGGTAGCTGAAGAGGCACAGG3' (SEQ ID No: 24)

suivie d'une deuxième étape d'amplification, effectuée avec l'amorce :

FuC : 5'ATATGAGGGACAATTGGAGAAGTGA3' (SEQ ID
No: 25)

et un mélange des amorces suivantes :

5 FuD1 : 5'TCTGTCTCTCTCTCCACCTTCTTCTT3' (SEQ ID
No: 26)

FuD2 : 5'TCTGTCTTGCTCTCCACCTTCTTCTT3' (SEQ ID
No: 27),

ledit mélange étant préférentiellement
effectué dans un rapport compris entre (10% :90%) et
10 (90% :10%) et tout préférentiellement entre (60% :40%) et
(40% :60%),

pour obtenir un segment d'ADN de 805 paires
de bases s'étendant des résidus 7635 à 8440 inclus et le
vecteur de l'étape (c) est un vecteur retroviral délété
15 de toute la région codant pour la portion extracellulaire
de la sous-unité gp41 de l'enveloppe du VIH-1, s'étendant
des résidus 7745 à 8263 inclus, et comporte un site de
restriction unique Mull.

20 17) Méthode d'analyse selon les
revendications 1, 2, 13 ou 14 , caractérisée en ce que
l'amplification de l'étape (b) est effectuée avec une
paire d'amorces :

25 NEU-A : 5'TAGAAAGAGCAGAAGACAGTGGCAATG3' (SEQ
ID No: 17) et

FIN-B : 5'TAGCTGAAGAGGCACAGG3' (SEQ ID No:
14), suivie d'une deuxième étape d'amplification, avec la
paire d'amorces:

30 NEU-C : 5'GTGGGTCACAGTCTATTATGGGG3' (SEQ ID
No: 18) et

FIN-D : 5'TCCACCTTCTTCTTCGATT3' (SEQ ID No:
16),

pour obtenir un fragment d'ADN compris entre 2106 et 2320 paires de bases s'étendant des résidus 6197-6222 jusqu'aux résidus 6197-6222 inclus et

5 en ce que le vecteur de l'étape (c) est un vecteur retroviral délété de toute la région codant pour la majorité de la sous-unité gp120 et de la portion extracellulaire de la gp41 de l'enveloppe du VIH-1, s'étendant des résidus 6480 à 8263 inclus, et comporte un site de restriction unique MluI.

10

18) Méthode d'analyse selon les revendication 1, 2, 13 ou 14, caractérisée en ce l'amplification de l'étape (b) avec une paire d'amorces encadrant une séquence d'acide nucléique susceptible de porter au moins une mutation dans le gène codant pour la protéine d'enveloppe est effectuée avec une paire d'amorces :

NEU-A : 5'TAGAAAGAGCAGAAGACAGTGGCAATG3' (SEQ ID No: 17) et

20 FuB : 5' GGTGGTAGCTGAAGAGGCACAGG3' (SEQ ID No: 24), suivie d'une deuxième étape d'amplification, avec les amorces:

NEU-C : 5'GTGGGTCACAGTCTATTATGGGG3' (SEQ ID No: 18) et un mélange des amorces

25 FuD1 :5'TCTGTCTCTCTCTCCACCTTCTTCTT3' (SEQ ID No: 26) et

FuD2 :5'TCTGTCTTGCTCTCCACCTTCTTCTT3' (SEQ ID No: 27),

30 ledit mélange étant préférentiellement effectué dans un rapport compris entre (10% :90%) et (90% :10%) et tout préférentiellement entre (60% :40%) et (40% :60%),

pour obtenir un fragment d'ADN de 2118 paires de bases s'étendant des résidus 6322 à 8440 inclus et le

vecteur de l'étape (c) est un vecteur retroviral délété de toute la région codant pour la majorité de la sous-unité gp120 et de la portion extracellulaire de la gp41 de l'enveloppe du VIH-1, s'étendant des résidus 6480 à 8263 inclus, et comporte un site de restriction unique Mull.

19) Méthode d'analyse selon les revendication 1, 2, 13 ou 14, caractérisée en ce que l'amplification de l'étape (b) avec une paire d'amorces encadrant une séquence d'acide nucléique susceptible de porter au moins une mutation dans le gène codant pour la protéine d'enveloppe est effectuée avec la paire d'amorces :

ED3 : 5'TTAGGCATCTCCTATGGCAGGAAGAAGCGG3' (SEQ ID No: 28) et

E01 : 5' TCCAGTCCCCCCTTTTCTTTTAAAAA3' (SEQ ID No: 29),

suivie d'une deuxième étape d'amplification, avec les amorces:

E10 : 5'GTGGGTCACAGTCTATTATGGGGT3' (SEQ ID No: 30) et

FuB : 5' GGTGGTAGCTGAAGAGGCACAGG3' (SEQ ID No: 24)

pour obtenir un fragment d'ADN de 2200 paires de bases s'étendant des résidus 6322 à 8522 inclus et le vecteur de l'étape (c) est un vecteur retroviral délété de toute la région codant pour la majorité de la sous-unité gp120 et de la portion extracellulaire de la gp41 de l'enveloppe du VIH-1, s'étendant des résidus 6480 à 8263 inclus, et comporte un site de restriction unique Mull.

20) Méthode d'analyse selon les revendication 1, 2, 13 ou 14, caractérisée en ce que l'amplification de l'étape (b) est effectuée avec une paire d'amorces :

E00 : 5'TAGAAAGAGCAGAAGACAGTGGCAATGA3' (SEQ

5 ID No: 19) et

ES8B : 5'CACTTCTCCAATTGTCCCTCA3' (SEQ ID No:

20),

suivie d'une deuxième étape d'amplification, avec la paire d'amorces:

10 E20: 5'GGGCCACACATGCCTGTGTACCCACAG3' (SEQ ID

No: 21) et

E115 : 5'AGAAAAATTCCCCTCCACAATTAA3' (SEQ ID

No: 22),

15 pour obtenir un segment d'ADN de 938 paires de bases s'étendant des résidus 6426 à 7364 inclus et

en ce que le vecteur de l'étape (c) est un vecteur retroviral délété de la région, codant pour les domaines allant de la boucle V1 à la boucle V3 de l'enveloppe du VIH-1 s'étendant de 6617 à 7250 inclus et

20 comporte un site de restriction unique NheI.

21) Méthode d'analyse selon les revendications 1, 2, 13 à 20 consistant à déterminer la susceptibilité d'un virus VIH à un composé inhibiteur de fusion ciblant la protéine gp41 du VIH-1, caractérisée en ce que l'on ajoute ledit composé inhibiteur de fusion, éventuellement à des concentrations différentes, durant la culture de l'hôte cellulaire obtenu à l'étape (e), avant l'étape (f) et en ce que l'étape (g) comprend la

30

comparaison de l'expression du gène marqueur avec et sans composé inhibiteur de fusion ciblant la gp41 du VIH-1.

22) Méthode d'analyse selon les revendication 1, 2, 13, 14 ou 16 consistant à déterminer la susceptibilité d'un virus VIH à un composé inhibiteur d'entrée dudit virus VIH dans une cellule cible, caractérisée en ce que l'on ajoute ledit composé inhibiteur d'entrée, éventuellement à des concentrations différentes, à l'hôte cellulaire obtenu à l'étape (e) avant l'infection de l'étape (f) et en ce que l'étape (g) comprend la comparaison de l'expression du gène marqueur avec et sans composé inhibiteur d'entrée.

23) Méthode d'analyse selon les revendications 1, 2, 13, 14 ou 17 consistant à déterminer la susceptibilité d'un virus VIH à l'action inhibitrice des anticorps, caractérisée en ce que ladite méthode est réalisée, d'une part sans anticorps et d'autre part avec l'anticorps, éventuellement à différentes concentrations, ledit anticorps étant présents à l'étape (e), et en ce que l'étape (g) comprend la comparaison de l'expression du gène marqueur avec et sans anticorps.

24) Méthode d'analyse selon les revendications 1, 2, 13, 14 ou 17 consistant à déterminer le tropisme d'un virus VIH pour un récepteur cellulaire, caractérisée en ce que l'infection de l'étape (f) avec les particules virales obtenues à l'étape (e) est effectuée sur deux hôtes cellulaires distincts et l'étape (g) comprend la comparaison de l'expression du gène marqueur par chacun des deux hôtes cellulaires distincts.

25) Méthode d'analyse selon la revendication 24 caractérisée en ce que l'un de deux hôtes cellulaires

infectés à l'étape (f) exprime le récepteur CCR5 et l'autre exprime le récepteur CXCR4.

26) Méthode d'analyse selon les
5 revendications 1, 2, 13, 14 ou 17 consistant à déterminer la susceptibilité d'un virus VIH à un composé inhibiteur ciblant les corécepteurs du VIH-1, caractérisée en ce que l'on ajoute ou non ledit composé inhibiteur ciblant les
10 corécepteurs du VIH-1, éventuellement à des concentrations différentes, durant l'étape (e) de culture, en ce que l'infection de l'étape (f) est effectuée sur deux hôtes cellulaires distincts et en ce que l'étape (g) comprend la comparaison de l'expression du gène marqueur par chacun des deux hôtes cellulaires
15 distincts.

27) Méthode d'analyse selon les
revendications 1, 2, 13, 14 ou 20 consistant à analyser le tropisme d'un virus VIH pour un récepteur cellulaire,
20 caractérisée en ce que l'infection de l'étape (f) avec les particules virales obtenues à l'étape (e) est effectuée sur deux hôtes cellulaires distincts et l'étape (g) comprend la comparaison de l'expression du gène marqueur par chacun des deux hôtes cellulaires distincts.

28) Méthode d'analyse selon les
25 revendications 1, 2, 13, 14 ou 20 consistant à analyser la susceptibilité d'un virus VIH à un composé inhibiteur ciblant les corécepteurs du VIH-1, caractérisée en ce que l'on ajoute ledit composé inhibiteur ciblant les
30 corécepteurs du VIH-1, éventuellement à des concentrations différentes, durant la culture de l'étape (d), en ce que l'infection de l'étape (f) avec les

particules virales obtenues à l'étape (e) est effectuée sur deux hôtes cellulaires distincts et en ce que l'étape (g) comprend la comparaison de l'expression du gène marqueur par chacun des deux hôtes cellulaires distincts.

5

29) Méthode d'analyse selon l'une quelconque des revendications 1 à 20 consistant à déterminer l'infectivité ou la capacité répliquative d'un virus VIH caractérisée en ce que l'étape (g) comprend la
10 comparaison de l'expression du gène marqueur par le second hôte cellulaire infecté avec les particules virales obtenues en appliquant les étapes (a) à (f) à un échantillon biologique d'un patient, et l'expression du gène marqueur par le même second hôte cellulaire infecté
15 avec les particules virales de référence obtenues en appliquant les étapes (a) à (f) à un échantillon contenant un virus de référence.

30) Méthode d'analyse selon la revendication
20 29 caractérisée en ce que les particules virales de référence issues d'un virus de référence sont des particules virales obtenues par l'application des étapes (a) à (f) à un échantillon biologique du même patient à un stade préalable du traitement thérapeutique ou avant
25 celui-ci.

31) Méthode d'analyse selon les revendications 1 à 20 consistant à déterminer la
susceptibilité d'un virus VIH à l'hydroxyurée,
30 caractérisée en ce que l'on ajoute ou non de l'hydroxyurée, éventuellement à des concentrations différentes, soit durant l'étape (e) de culture, soit au deuxième hôte cellulaire, avant l'infection de celui-ci à

l'étape (f) et en ce que l'étape (g) comprend la comparaison de l'expression du gène marqueur avec et sans hydroxyurée.

5 32) Méthode d'analyse selon l'une quelconque des revendications 1 à 31 caractérisé en ce que l'étape (e) de culture est effectuée durant une période allant de 12 heures à 72 heures, de préférence de 24 heures à 48 heures.

10

33) Un kit pour la mise en oeuvre d'une méthode selon l'une quelconque des revendications 1 à 32 caractérisé en ce qu'il comprend :

15 i) une paire d'amorces encadrant une séquence d'acide nucléique du génome viral susceptible de porter au moins une mutation,

20 ii) un vecteur comprenant les parties d'un génome d'un virus VIH nécessaires à la réplication virale à l'exception du segment amplifié avec les amorces définies en (i) et du gène codant pour la protéine d'enveloppe,

 iii) un second vecteur comprenant un gène codant pour une protéine d'enveloppe,

25 iv) un premier hôte cellulaire susceptible d'être infecté par un virus VIH,

 v) un second hôte cellulaire susceptible d'être infecté par un virus VIH et comportant un gène marqueur activable uniquement à la suite de l'infection virale,

30

 vi) les produits et réactifs nécessaires pour réaliser l'amplification par PCR,

 vii) les produits et réactifs permettant la détection du marqueur exprimé.

34) Un kit selon la revendication 33, caractérisé en ce qu'il comprend :

i) les paires d'amorces de séquences :

- SEQ ID No : 1 et SEQ ID No : 2

- SEQ ID No : 3 et SEQ ID No : 4

ii) un vecteur retroviral délété de la région du cadre de lecture pol codant pour la protéase du VIH-1 s'étendant des résidus 1505 à 2565 inclus, délété de la région d'enveloppe et comportant un site unique de restriction MluI,

iii) un virus pseudotypé avec un gène codant pour une protéine d'enveloppe.

iv) un premier hôte cellulaire susceptible d'être infecté par un virus VIH,

v) un second hôte cellulaire susceptible d'être infecté par un virus VIH et comportant un gène marqueur activable uniquement à la suite de l'infection virale,

vi) les produits et réactifs nécessaires pour réaliser l'amplification par PCR,

vii) les produits et réactifs permettant la détection du marqueur exprimé.

35) Un kit selon la revendication 33, caractérisé en ce qu'il comprend :

i) les paires d'amorces de séquences :

- SEQ ID No : 5 et SEQ ID No : 7

- SEQ ID No : 6 et SEQ ID No : 8

ii) un vecteur retroviral délété de la région du cadre de lecture pol codant pour la transcriptase inverse du VIH-1, s'étendant des résidus 2618 à 2872 inclus, et comportant un site unique de restriction MluI,

iii) un virus pseudotypé par un gène codant pour une protéine d'enveloppe,

iv) un premier hôte cellulaire susceptible d'être infecté par un virus VIH,

5 v) un second hôte cellulaire susceptible d'être infecté par un virus VIH et comportant un gène marqueur activable uniquement à la suite de l'infection virale,

10 vi) les produits et réactifs nécessaires pour réaliser l'amplification par PCR,

vii) les produits et réactifs permettant la détection du marqueur exprimé.

15 36) Un kit selon la revendication 33, caractérisé en ce qu'il comprend :

i) les paires d'amorces de séquences :

- SEQ ID No : 9 et SEQ ID No : 10

- SEQ ID No : 11 et SEQ ID No : 12

20 ii) un vecteur retroviral délété de toute la région du cadre de lecture pol codant pour l'intégrase du VIH-1 s'étendant des résidus 4228 à 5093 inclus et de la région codant pour l'enveloppe virale entre les positions 6343 et 7611 incluses,

25 iii) un virus pseudotypé par un gène codant pour une protéine d'enveloppe,

iv) un premier hôte cellulaire susceptible d'être infecté par un virus VIH,

30 v) un second hôte cellulaire susceptible d'être infecté par un virus VIH et comportant un gène marqueur activable uniquement à la suite de l'infection virale,

vi) les produits et réactifs nécessaires pour réaliser l'amplification par PCR,

vii) les produits et réactifs permettant la détection du marqueur exprimé.

37) Un kit selon la revendication 33, caractérisé en ce qu'il comprend :

i) les paires d'amorces de séquences

- SEQ ID No : 13 et SEQ ID No : 14

- SEQ ID No : 15 et SEQ ID No : 16

ii) un vecteur retroviral délété de toute la région codant pour la portion extracellulaire de la sous-unité gp41 de l'enveloppe du VIH-1, s'étendant des résidus 7745 à 8263 inclus, et comportant un site de restriction unique Mull,

iii) un virus pseudotypé par un gène codant pour une protéine d'enveloppe,

iv) un premier hôte cellulaire susceptible d'être infecté par un virus VIH,

v) un second hôte cellulaire susceptible d'être infecté par un virus VIH et comportant un gène marqueur activable uniquement à la suite de l'infection virale,

vi) les produits et réactifs nécessaires pour réaliser l'amplification par PCR,

vii) les produits et réactifs permettant la détection du marqueur exprimé.

38) Un kit selon la revendication 33, caractérisé en ce qu'il comprend :

i) les paires d'amorces de séquences

- SEQ ID No : 23 et SEQ ID No : 24

- SEQ ID No : 25 et SEQ ID No : 26 avec SEQ ID No : 27

ii) un vecteur retroviral délété de toute la région codant pour la portion extracellulaire de la sous-unité gp41 de l'enveloppe du VIH-1, s'étendant des résidus 7745 à 8263 inclus, et comportant un site de restriction unique Mull,

iii) un virus pseudotypé par un gène codant pour une protéine d'enveloppe,

iv) un premier hôte cellulaire susceptible d'être infecté par un virus VIH,

v) un second hôte cellulaire susceptible d'être infecté par un virus VIH et comportant un gène marqueur activable uniquement à la suite de l'infection virale,

vi) les produits et réactifs nécessaires pour réaliser l'amplification par PCR,

vii) les produits et réactifs permettant la détection du marqueur exprimé.

39) Un kit selon la revendication 33, caractérisé en ce qu'il comprend :

i) les paires d'amorces de séquences

- SEQ ID No : 17 et SEQ ID No : 14

- SEQ ID No : 18 et SEQ ID No : 16

ii) un vecteur retroviral délété de toute la région codant pour la majorité de la sous-unité gp120 et de la portion extracellulaire de la gp41 de l'enveloppe du VIH-1, s'étendant des résidus 6480 à 8263 inclus, et comportant un site de restriction unique Mull,

iii) un virus pseudotypé par un gène codant pour une protéine d'enveloppe,

iv) un premier hôte cellulaire susceptible d'être infecté par un virus VIH,

v) un second hôte cellulaire susceptible d'être infecté par un virus VIH et comportant un gène marqueur activable uniquement par des particules virales,

vi) les produits et réactifs nécessaires pour réaliser l'amplification par PCR,

vii) les produits et réactifs permettant la détection du marqueur exprimé.

40) Un kit selon la revendication 33, caractérisé en ce qu'il comprend :

i) les paires d'amorces de séquences

- SEQ ID No : 17 et SEQ ID No : 24

- SEQ ID No : 18 et SEQ ID No : 26 et SEQ ID No : 27

ii) un vecteur retroviral délété de toute la région codant pour la majorité de la sous-unité gp120 et de la portion extracellulaire de la gp41 de l'enveloppe du VIH-1, s'étendant des résidus 6480 à 8263 inclus, et comportant un site de restriction unique Mull,

iii) un virus pseudotypé par un gène codant pour une protéine d'enveloppe,

iv) un premier hôte cellulaire susceptible d'être infecté par un virus VIH,

v) un second hôte cellulaire susceptible d'être infecté par un virus VIH et comportant un gène marqueur activable uniquement par des particules virales,

vi) les produits et réactifs nécessaires pour réaliser l'amplification par PCR,

vii) les produits et réactifs permettant la détection du marqueur exprimé.

41) Un kit selon la revendication 33, caractérisé en ce qu'il comprend :

i) les paires d'amorces de séquences

- SEQ ID No : 19 et SEQ ID No : 20

- SEQ ID No : 21 et SEQ ID No : 22

ii) un vecteur retroviral délété de la région, codant pour les domaines allant de la boucle V1 à la boucle V3 de l'enveloppe du VIH-1 s'étendant de 6617 à 7250 inclus et comportant un site de restriction unique NheI,

iii) un virus pseudotypé par un gène codant pour une protéine d'enveloppe,

iv) un premier hôte cellulaire susceptible d'être infecté par un virus VIH,

v) un second hôte cellulaire susceptible d'être infecté par un virus VIH et comportant un gène marqueur activable uniquement à la suite de l'infection virale,

vi) les produits et réactifs nécessaires pour réaliser l'amplification par PCR,

vii) les produits et réactifs permettant la détection du marqueur exprimé.

42) Un kit selon la revendication 33, caractérisé en ce qu'il comprend :

i) les paires d'amorces de séquences:

(SEQ ID No : 5) et (SEQ ID No : 6),

(SEQ ID No : 7) et (SEQ ID No : 8)

ii) un vecteur rétroviral délété de la région du cadre de lecture pol codant pour la transcriptase inverse du VIH-1, s'étendant des résidus 2618 à 2872 inclus, et comportant un site unique de restriction MluI.

iii) un virus pseudotypé par un gène codant pour une protéine d'enveloppe,

iv) un premier hôte cellulaire susceptible d'être infecté par un virus VIH,

5 v) un second hôte cellulaire susceptible d'être infecté par un virus VIH et comportant un gène marqueur activable uniquement à la suite de l'infection virale,

10 vi) les produits et réactifs nécessaires pour réaliser l'amplification par PCR,

vii) les produits et réactifs permettant la détection du marqueur exprimé.

15 43) Un kit selon la revendication 33, caractérisé en ce qu'il comprend :

i) les paires d'amorces de séquences:

(SEQ ID No: 28) et (SEQ ID No: 29) et

(SEQ ID No: 30) et (SEQ ID No: 24)

20 ii) un vecteur retroviral délété de toute la région codant pour la majorité de la sous-unité gp120 et de la portion extracellulaire de la gp41 de l'enveloppe du VIH-1, s'étendant des résidus 6480 à 8263 inclus, et comporte un site de restriction unique Mull,

25 iii) un virus pseudotypé par un gène codant pour une protéine d'enveloppe,

iv) un premier hôte cellulaire susceptible d'être infecté par un virus VIH,

30 v) un second hôte cellulaire susceptible d'être infecté par un virus VIH et comportant un gène marqueur activable uniquement à la suite de l'infection virale,

vi) les produits et réactifs nécessaires pour réaliser l'amplification par PCR,

vii) les produits et réactifs permettant la
détection du marqueur exprimé.

1/6

Figure 1

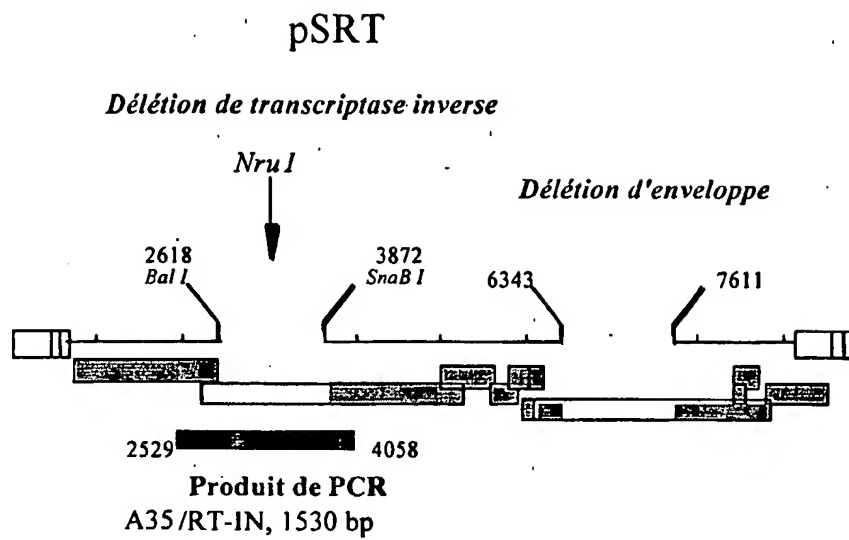
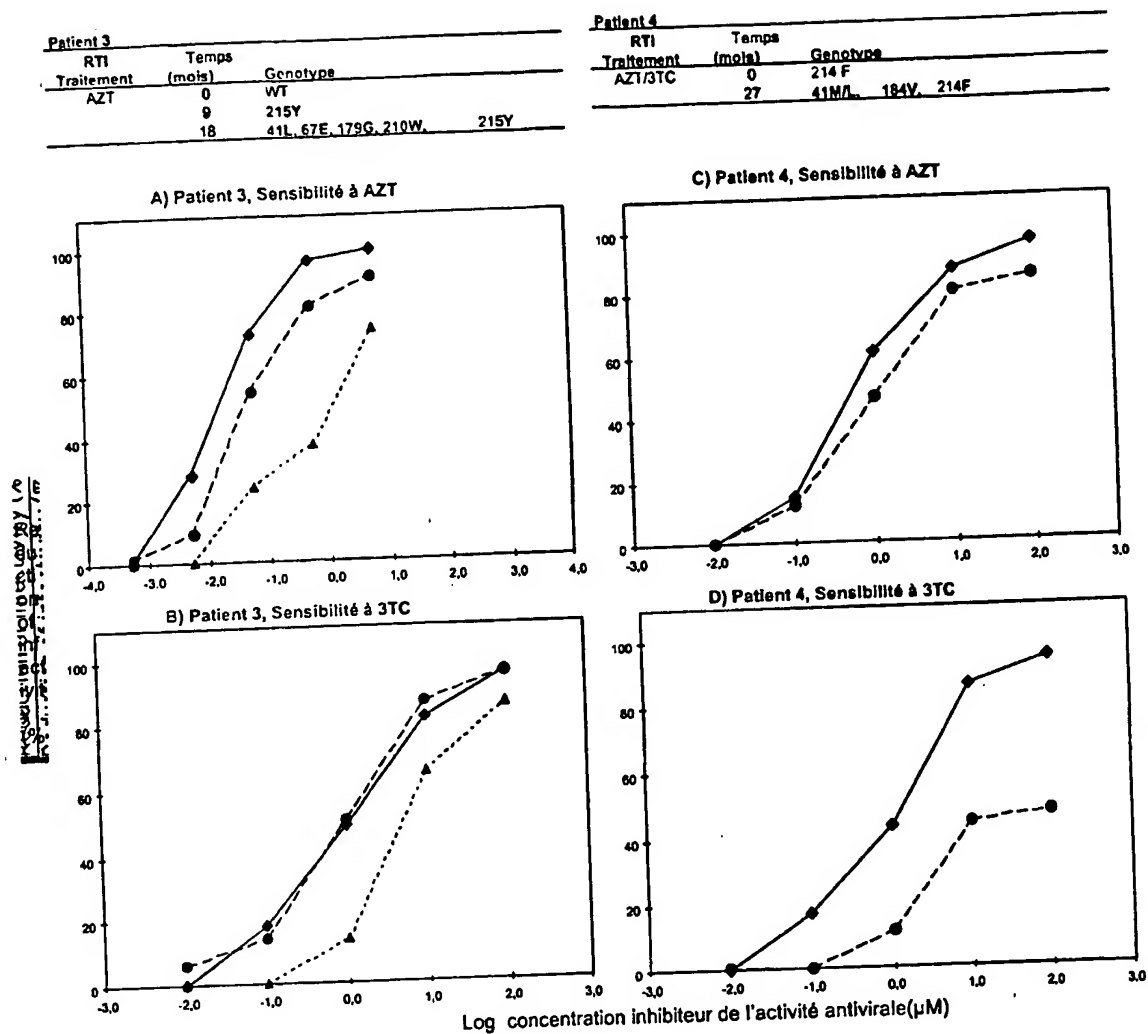


Figure 2

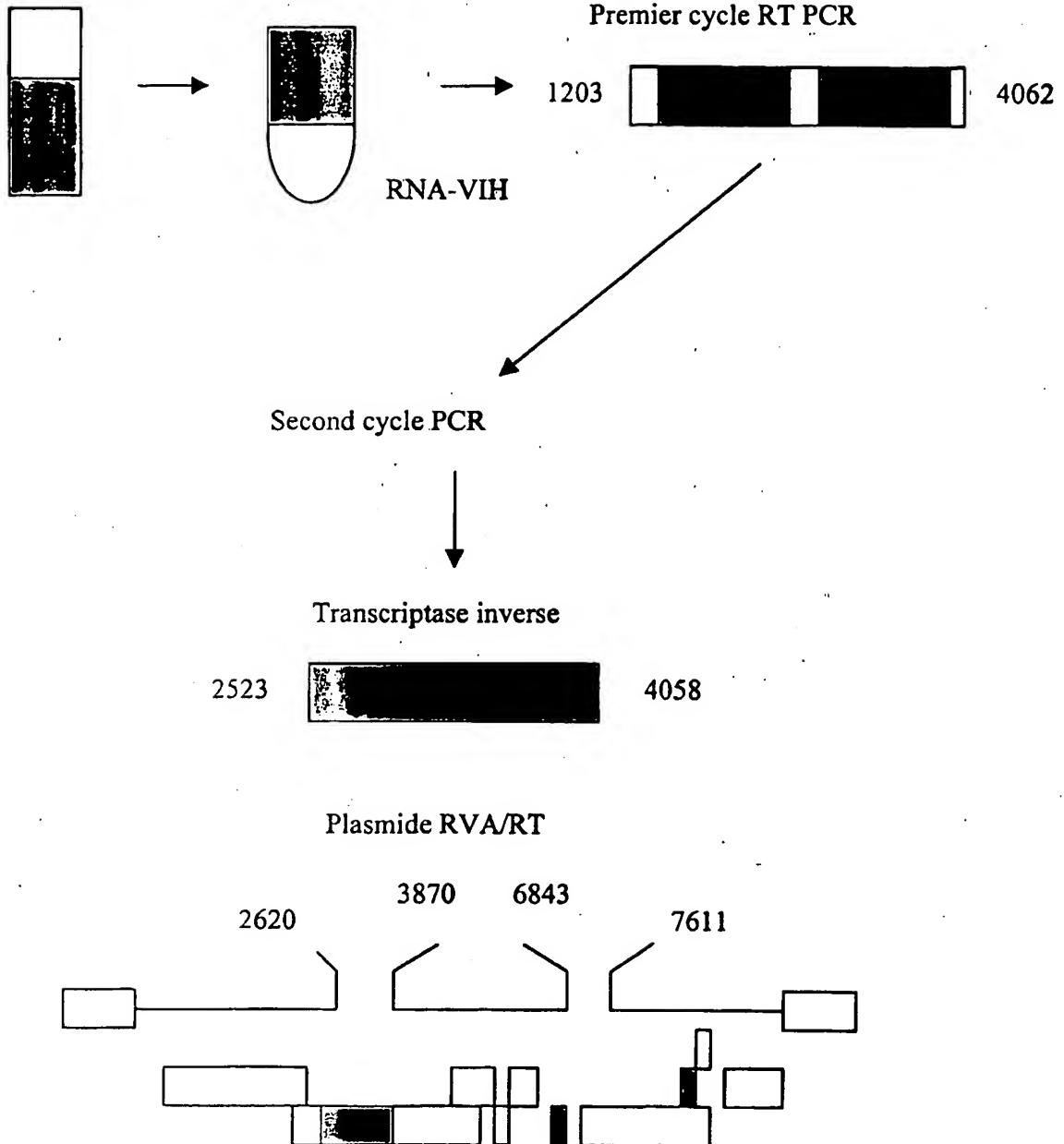


3/6

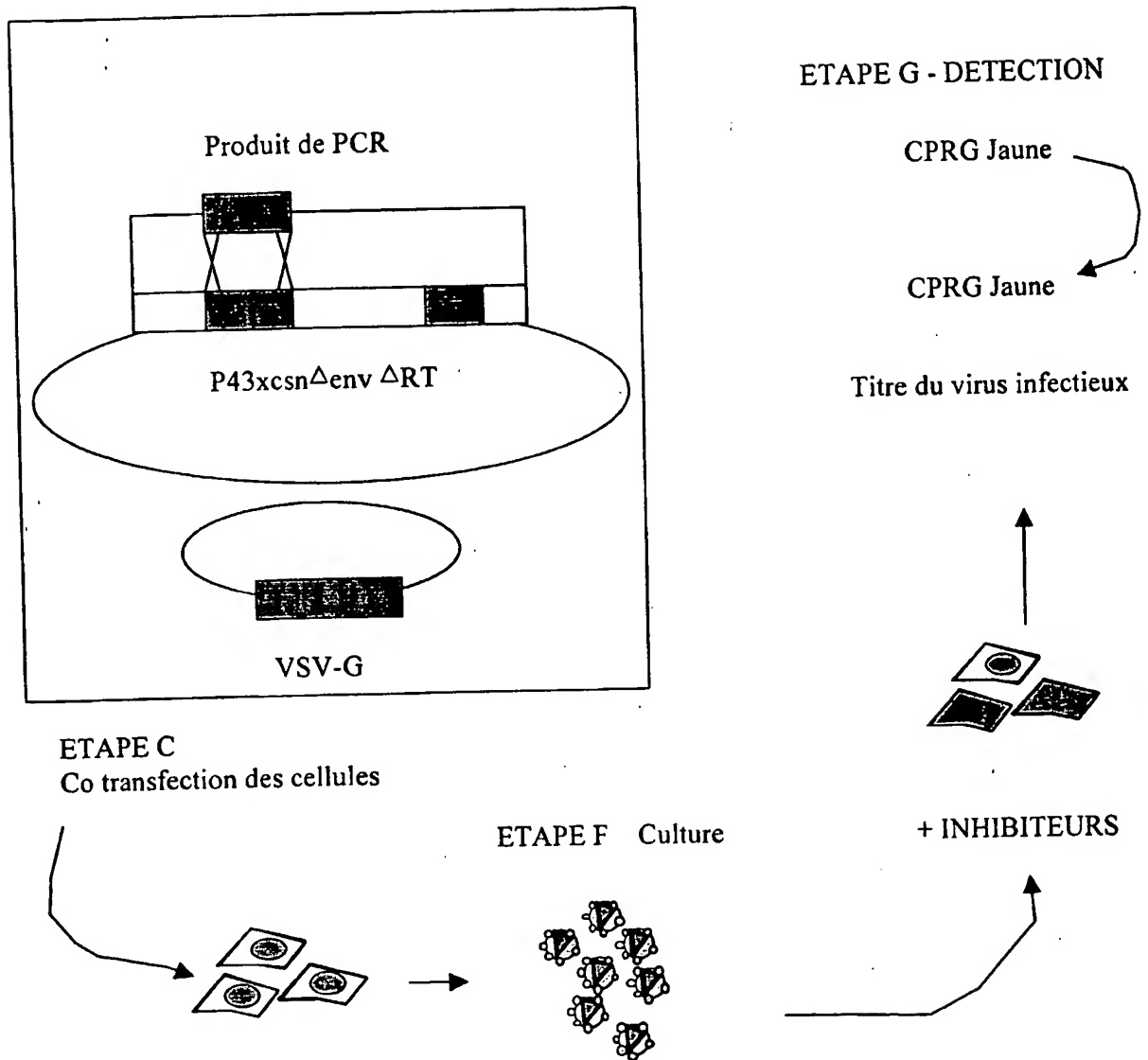
Figure 3

ETAPE A

Echantillon de plasma

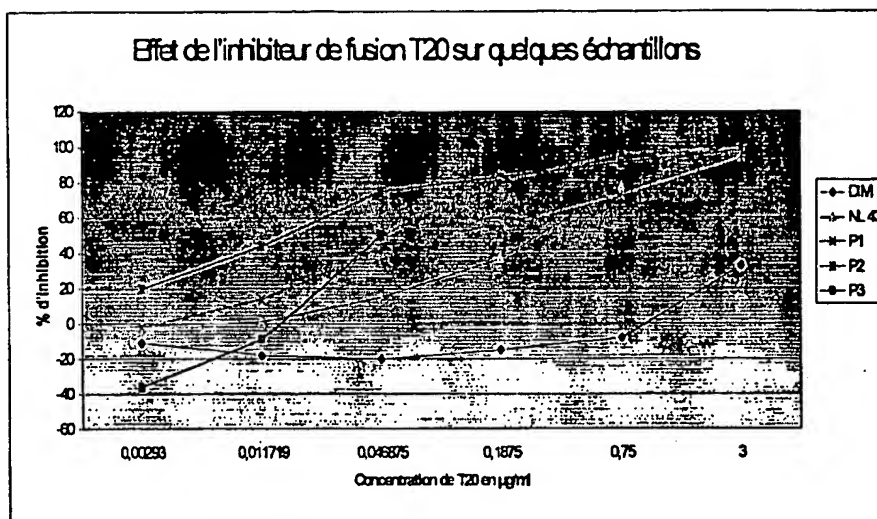


4/6
Figure 4



5/6

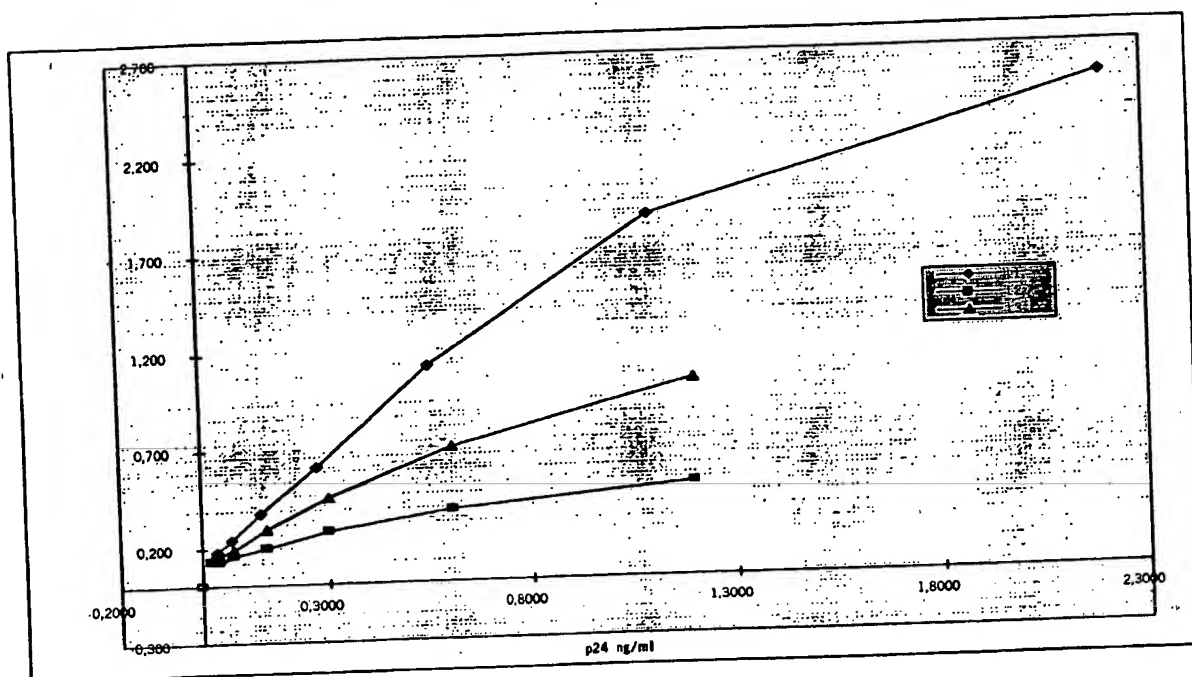
figure 5



6/6

Figure 6

Calcul de la capacité répliquative (infectivité)



LISTE DE SEQUENCES

<110> BIOALLIANCE
INSERM

<120> Nouvelle méthode d'analyse des caractéristiques
phénotypiques des virus de l'immunodéficience humaine.

<130> B7780PCT 8nov2001

<140> PCT/FR2000-xxxx

<141> 2001-11-09

<150> FR00/14495

<151> 2000-11-10

<150> FR01/03970

<151> 2001-03-23

<160> 31

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 20

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(20)

<223> Séquence Fit A pour l'amplification d'une région
du gène codant pour la protéase.

<220>

<223> Description de la séquence artificielle:amorce

<400> 1

tcacctagaa ctttaaagtc

20

<210> 2

<211> 23

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(23)

<223> Séquence Pro A pour l'amplification d'une région
du gène de la protéase.

<220>

<223> Description de la séquence artificielle:amorce

<400> 2

ggcaaatact ggagtattgt atg

23

<210> 3

<211> 20
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(20)
<223> Séquence Fit B pour l'amplification d'une région
du gène de la protéase.

<220>
<223> Description de la séquence artificielle:amorce

<400> 3
agaactttaa atgcatgggt

20

<210> 4
<211> 23
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(23)
<223> séquence Pro B pour l'amplification d'une région
du gène de la protéase;

<220>
<223> Description de la séquence artificielle:amorce

<400> 4
ggagtattgt atggattttc agg

23

<210> 5
<211> 20
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(20)
<223> Séquence MJ33 pour l'amplification d'une région du
gène de la transcriptase inverse.

<220>
<223> Description de la séquence artificielle:amorce

<400> 5
agtaggacct acacctgtca

20

<210> 6
<211> 20
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>
<221> misc_feature

<222> (1)..(20)

<223> Séquence RT-EXT pour l'amplification d'une région du gène de la transcriptase inverse.

<220>

<223> Description de la séquence artificielle:amorces

<400> 6

ttcccaatgc atattgtgag

20

<210> 7

<211> 32

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(32)

<223> Séquence A35 pour l'amplification d'une région du gène de la transcriptase inverse.

<220>

<223> Description de la séquence artificielle:amorces

<400> 7

ttggttgcatt aaattttccc attagtccta tt

32

<210> 8

<211> 20

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(20)

<223> Séquence RT-IN pour l'amplification d'une région du gène de la transcriptase inverse.

<220>

<223> Description de la séquence artificielle:amorces

<400> 8

ttcccaatgc atattgtgag

20

<210> 9

<211> 22

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(20)

<223> Séquence INT B + pour l'amplification d'une région du gène de l'intégrase.

<220>

<223> Description de la séquence artificielle:amorces

<400> 9
gttactaata gaggaagaca aa

22

<210> 10
<211> 19
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(19)
<223> Séquence INT B - pour l'amplification d'une
région du gène de l'intégrase.

<220>
<223> Description de la séquence artificielle:amorce

<400> 10
ttttggtggtt attaattgct

19

<210> 11
<211> 20
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(20)
<223> Séquence INT V + pour l'amplification d'une
région du gène de l'intégrase.

<220>
<223> Description de la séquence artificielle:amorce

<400> 11
cacccctaact gacacaacaa

20

<210> 12
<211> 20
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(20)
<223> séquence INT V - pour l'amplification d'une région
du gène de l'intégrase.

<220>
<223> Description de la séquence artificielle:a morce

<400> 12
aaggcctttc ttatagcaga

20

<210> 13

<211> 20
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(20)
<223> Séquence FIN-A pour l'amplification d'une région
du gène de l'enveloppe.

<220>
<223> Description de la séquence artificielle:amorce

<400> 13
tc̑aatatta cagggctgct

20

<210> 14
<211> 18
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(18)
<223> Séquence FIN-B pour l'amplification d'une région
du gène de l'enveloppe.

<220>
<223> Description de la séquence artificielle:amorce

<400> 14
tagctgaaga ggcacagg

18

<210> 15
<211> 20
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(20)
<223> Séquence FIN-C pour l'amplification d'une région
du gène de l'enveloppe.

<220>
<223> Description de la séquence artificielle:amorce

<400> 15
ctattaacaa gagatggtgg

20

<210> 16
<211> 19
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>
<221> misc_feature

<222> (1)..(19)

<223> Séquence FIN-D pour l'amplification d'une région
du gène de l'enveloppe.

<220>

<223> Description de la séquence artificielle:amorce

<400> 16

tccaccttct tcttcgatt

19

<210> 17

<211> 27

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(26)

<223> Séquence NEU -A pour l'amplification d'une région
du gène de l'enveloppe.

<220>

<223> Description de la séquence artificielle:amorce

<400> 17

tagaaagagc agaagacagt ggcaatg

27

<210> 18

<211> 23

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(23)

<223> Séquence NEU -C pour l'amplification d'une région
du gène de l'enveloppe.

<220>

<223> Description de la séquence artificielle:amorce

<400> 18

gtgggtcaca gtctattatg ggg

23

<210> 19

<211> 28

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(28)

<223> Séquence E00 pour l'amplification d'une région du
gène de l'enveloppe.

<220>

<223> Description de la séquence artificielle:amorce

<400> 19
tagaaagagc agaagacagt ggcaatga

28

<210> 20
<211> 21
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(20)
<223> séquence ES8B pour l'amplification d'une région
du gène de l'enveloppe.

<220>
<223> Description de la séquence artificielle:amorce

<400> 20
cacttctcca attgtccctc a

21

<210> 21
<211> 27
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(27)
<223> Séquence E20 pour l'amplification d'une région du
gène de l'enveloppe.

<220>
<223> Description de la séquence artificielle:amorce

<400> 21
gggccacaca tgcctgtgta cccacag

27

<210> 22
<211> 24
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(24)
<223> Séquence E115 pour l'amplification d'une région
du gène de l'enveloppe.

<220>
<223> Description de la séquence artificielle:amorce

<400> 22
agaaaaattc ccctccacaa ttaa

24

<210> 23

<211> 22
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de la séquence artificielle:amorce

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(22)
<223> Séquence FuA pour l'amplification d'une région du
gène de l'enveloppe.

<400> 23
aagcaatgta tgcccctccc at

22

<210> 24
<211> 23
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de la séquence artificielle:amorce

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(23)
<223> Séquence FuB pour l'amplification d'une partie du
gène d'enveloppe.

<400> 24
ggtggtagct gaagaggcac agg

23

<210> 25
<211> 25
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de la séquence artificielle:amorce

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(25)
<223> Séquence FuC pour l'amplification d'une partie du
gène d'enveloppe.

<400> 25
atatgaggga caattggaga agtga

25

<210> 26
<211> 26
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de la séquence artificielle:amorce

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(26)
<223> Séquence FuD1 utilisé pour amplifier une partie du
gène de l'enveloppe.

<400> 26
tctgtctctc tctccacctt cttctt

26

<210> 27
<211> 26
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de la séquence artificielle:amorce

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(26)
<223> Séquence FuD2 pour l'amplification d'une partie du
gène de l'enveloppe.

<400> 27
tctgtcttgc tctccacctt cttctt

26

<210> 28
<211> 30
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(30)
<223> Amorce ED3

<220>
<223> Description de la séquence artificielle:amorce

<400> 28
ttaggcattct cctatggcag gaagaagcgg

30

<210> 29
<211> 26
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de la séquence artificielle:amorce

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(26)
<223> Amorce E01 pour l'amplification d'une partie de
l'enveloppe.

<400> 29
tccagtcccc ccttttcttt taaaaa

26

<210> 30
<211> 24
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de la séquence artificielle:amorce

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(24)
<223> Amorce E10 pour l'amplification d'une partie de
l'enveloppe.

<400> 30
gtgggtcaca gtctattatg gggt

24

<210> 31
<211> 19
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de la séquence artificielle:amorce

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(19)
<223> Amorce gag+, permettant l'amplification d'une
partie de gag.

<400> 31
aggggcaaat ggtacatca

19

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la Propriété
Intellectuelle
Bureau international



(43) Date de la publication internationale
16 mai 2002 (16.05.2002)

PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 02/038792 A3

(51) Classification internationale des brevets⁷ : C12Q 1/70,
C12N 15/86

Joffre, F-92250 La Garenne-Colombes (FR). TROUPLIN,
Virginie [FR/FR]; 70, avenue d'Italie, F-75013 Paris (FR).

(21) Numéro de la demande internationale :
PCT/FR01/03512

(74) Mandataires : BREESE, Pierre etc.; Breese-Majerowicz,
3, avenue de l'Opéra, F-75001 Paris (FR).

(22) Date de dépôt international :
9 novembre 2001 (09.11.2001)

(81) États désignés (*national*) : AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ,
BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ,
DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM,
HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK,
LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX,
MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI,
SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU,
ZA, ZW.

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :
00/14495 10 novembre 2000 (10.11.2000) FR
01/03970 23 mars 2001 (23.03.2001) FR
09/817,135 27 mars 2001 (27.03.2001) US

(84) États désignés (*régional*) : brevet ARIPO (GH, GM, KE,
LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), brevet eurasien
(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen
(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU,
MC, NL, PT, SE, TR), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI,
CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(71) Déposants (*pour tous les États désignés sauf US*) :
BIOALLIANCE PHARMA [FR/FR]; 59, rue du Général
Martial Valin, F-75015 Paris (FR). INSERM [FR/FR];
101, rue de Tolbiac, F-75654 Paris Cedex 13 (FR).

Publiée :
— avec rapport de recherche internationale

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (*pour US seulement*) : CLAVEL,
François [FR/FR]; 31, boulevard Malesherbes, F-75008
Paris (FR). MAMMANO, Fabrizio [FR/FR]; 43, rue
Réaumur, F-75003 Paris (FR). RACE, Esther [FR/FR];
62, avenue Aristide Briand, F-92120 Montrouge (FR).
DAM, Elisabeth [FR/FR]; 87, rue Championnet, F-75018
Paris (FR). OBRY, Véronique [FR/FR]; 31bis, avenue

(88) Date de publication du rapport de recherche
internationale: 25 septembre 2003

En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abrégia-
tions, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et
abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de
la Gazette du PCT.

(54) Title: NOVEL METHOD FOR ANALYSING PHENOTYPIC CHARACTERISTICS OF HUMAN IMMUNODEFICIENCY
VIRUS (HIV)

A3 (54) Titre: NOUVELLE METHODE D'ANALYSE DES CARACTERISTIQUES PHENOTYPIQUES DES VIRUS DE L'IMMU-
NODEFICIENCE HUMAINE (VIH)

WO 02/038792 (57) Abstract: The invention concerns a method for analysing characteristics exhibited by certain virus strains, in particular, the
human immunodeficiency viruses, using the construct of a recombinant virus obtained by homologous recombining. The invention
also concerns a kit comprising primers, vectors, cell hosts, products and reagents necessary for producing PCR amplification, and
the products and reagents for detecting a marker, for implementing the inventive method.

(57) Abrégé : La présente invention concerne une méthode d'analyse des caractéristiques phénotypiques présentées par certaines
souches de virus, notamment les virus de l'immunodéficience humaine, mettant en oeuvre la construction d'un virus recombinant
obtenu par recombinaison homologue. La présente invention concerne également un kit comprenant les amorces, les vecteurs, les
hôtes cellulaires, les produits et réactifs nécessaires pour réaliser une amplification par PCR, et les produits et réactifs permettant la
détection d'un marqueur, pour la mise en oeuvre de la méthode de l'invention.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 Internati plication No
 PCT/FR 01/03512

 A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
 IPC 7 C12Q1/70 C12N15/86

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C12Q C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS, MEDLINE, CHEM ABS Data, EMBASE, SEQUENCE SEARCH

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 6 103 462 A (CHARNEAU PIERRE ET AL) 15 August 2000 (2000-08-15) cited in the application	1-4, 29-34
Y	the whole document	5-28, 35-43
Y	--- KELLAM P ET AL: "RECOMBINANT VIRUS ASSAY: A RAPID, PHENOTYPIC ASSAY FOR ASSESSMENT OF DRUG SUSCEPTIBILITY OF HUMAN IMMUNODEFICIENCY VIRUS TYPE 1 ISOLATES" ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY, AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY, WASHINGTON, DC, US, vol. 38, no. 1, January 1994 (1994-01), pages 23-30, XP000952459 ISSN: 0066-4804 cited in the application the whole document ---	5,6,9, 35,42

-/--

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- *Z* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

21 February 2003

Date of mailing of the international search report

03/03/2003

Name and mailing address of the ISA

 European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
 NL - 2280 HV Rijswijk
 Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
 Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Reuter, U

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Internat

lication No

PCT/FR 01/03512

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	ROBINSON LAURENCE H ET AL: "HIV type 1 protease cleavage site mutations and viral fitness: Implications for drug susceptibility phenotyping assays." AIDS RESEARCH AND HUMAN RETROVIRUSES, vol. 16, no. 12, 10 August 2000 (2000-08-10), pages 1149-1156, XP002183817 ISSN: 0889-2229 the whole document ---	7,8
Y	HEILEK-SNYDER G M ET AL: "Measuring HIV-1 integrase inhibitor susceptibility using a recombinant virus-based, single cycle replication assay." ABSTRACTS OF THE INTERSCIENCE CONFERENCE ON ANTIMICROBIAL AGENTS AND, vol. 40, 2000, page 300 XP001025652 40th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy; Toronto, Ontario, Canada; September 17-20, 2000, 2000 abstract ---	10-12,36
Y	SCARLATTI GABRIELLA ET AL: "In vivo evolution of HIV-1 co-receptor usage and sensitivity to chemokine-mediated suppression." NATURE MEDICINE, vol. 3, no. 11, November 1997 (1997-11), pages 1259-1265, XP001024255 ISSN: 1078-8956 the whole document ---	13-28, 37-41,43
Y	WILLEY ET AL: "Amino acid substitutions in the human immunodeficiency virus type 1 gp120 V3 loop that change viral tropism also alter physical and functional properties of the virion envelope" JOURNAL OF VIROLOGY, THE AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY, US, vol. 68, no. 7, July 1994 (1994-07), pages 4409-4419, XP002119922 ISSN: 0022-538X the whole document ---	13-28, 37-41,43
Y	LIN PIN-FANG ET AL: "Characterization of siamycin I, a human immunodeficiency virus fusion inhibitor." ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY, vol. 40, no. 1, 1996, pages 133-138, XP001016383 ISSN: 0066-4804 the whole document ---	13-28, 37-41,43
	--- -/--	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 Internati llation No
 PCT/FR 01/03512

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>RACE ESTHER ET AL: "Analysis of HIV cross-resistance to protease inhibitors using a rapid single-cycle recombinant virus assay for patients failing on combination therapies." AIDS (HAGERSTOWN), vol. 13, no. 15, 22 October 1999 (1999-10-22), pages 2061-2068, XP001016325 ISSN: 0269-9370 the whole document</p> <p>---</p>	1-4, 29-34
A	<p>US 5 837 464 A (CAPON DANIEL ET AL) 17 November 1998 (1998-11-17) the whole document</p> <p>---</p>	1-43
A	<p>HERTOGS K ET AL: "A RAPID METHOD FOR SIMULTANEOUS DETECTION OF PHENOTYPIC RESISTANCE TO INHIBITORS OF PROTEASE AND REVERSE TRANSCRIPTASE IN RECOMBINANT HUMAN IMMUNODEFICIENCY VIRUS TYPE 1 ISOLATES FROM FROM PATIENTS TREATED WITH ANTIRETROVIRAL DRUGS" ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY, AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY, WASHINGTON, DC, US, vol. 42, no. 2, February 1998 (1998-02), pages 269-278, XP000946883 ISSN: 0066-4804 the whole document</p> <p>---</p>	1-43
A	<p>MARTINEZ-PICADO J ET AL: "ANTIRETROVIRAL RESISTANCE TESTING. HUMAN IMMUNODEFICIENCY VIRUS TYPE 1 CLONING VECTORS FOR" JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY, WASHINGTON, DC, US, vol. 37, no. 9, September 1999 (1999-09), pages 2943-2951, XP000886935 ISSN: 0095-1137 the whole document</p> <p>---</p>	1-43
A	<p>WO 00 66774 A (BLAIR EDWARD DUNCAN ;ROBINSON LAURENCE HENRY (GB); SNOWDEN BARBARA) 9 November 2000 (2000-11-09) page 5 page 11-17; figure 3</p> <p>---</p>	1-43
	<p>---</p> <p>-/--</p>	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Internationa Application No

PCT/FR 01/03512

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,X	TROUPLIN VIRGINIE ET AL: "Determination of coreceptor usage of human immunodeficiency virus type 1 from patient plasma samples by using as recombinant phenotypic assay." JOURNAL OF VIROLOGY, vol. 75, no. 1, January 2001 (2001-01), pages 251-259, XP002183818 ISSN: 0022-538X the whole document	1,2,13, 20,21, 27-33,41
P,X	MASQUELIER BERNARD ET AL: "Genotypic and phenotypic resistance patterns of human immunodeficiency virus type 1 variants with insertions or deletions in the reverse transcriptase (RT): Multicenter study of patients treated with RT inhibitors." ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY, vol. 45, no. 6, June 2001 (2001-06), pages 1836-1842, XP001016398 ISSN: 0066-4804 the whole document	1,2,5,6, 9,29-33, 35,42

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/FR 01/03512

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

SEE SUPPLEMENTARY SHEET

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☒ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

The International Searching Authority has determined that this international application contains more than one invention or group of inventions, namely

1. Claims 1, 2, 29-33 (partially) and 3, 4, 34 (in full)

Method for analysing a phenotypic HIV virus characteristic, characterised in that PCR amplification is performed with a pair of primers flanking a nucleic acid sequence coding for part of the gag protein and a nucleic acid sequence coding for the human immunodeficiency virus protease, and kit characterised in that it includes said primers.

2. Claims 1, 2, 29-33 (partially) and 5, 6, 9, 35, 42 (in full)

Method for analysing a phenotypic HIV virus characteristic, characterised in that PCR amplification is performed with a pair of primers flanking a nucleic acid sequence that may have at least one mutation in the gene coding for the reverse transcriptase, and kit characterised in that it includes said primers.

3. Claims 1, 2, 29-33 (partially) and 3, 4, 34 (in full)

Method for analysing a phenotypic HIV virus characteristic, characterised in that PCR amplification is performed with a pair of primers flanking a nucleic acid sequence coding for part of the gag protein, for the protease and for part of the human immunodeficiency virus reverse transcriptase.

4. Claims 1, 2, 29-33 (partially) and 10-12, 36 (in full)

Method for analysing a phenotypic HIV virus characteristic, characterised in that PCR amplification is performed with a pair of primers flanking a nucleic acid sequence that may have at least one mutation in the gene coding for the integrase, and kit characterised in that it includes said primers.

5. Claims 1, 2, 29-33 (partially) and 13-28, 37-41, 43 (in full)

Method for analysing a phenotypic HIV virus characteristic, characterised in that PCR amplification is performed with a pair of

primers flanking a nucleic acid sequence that may have at least one mutation in the gene coding for the envelope protein, and kit characterised in that it includes said primers.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

information on patent family members

Internal

Application No

PCT/FR 01/03512

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 6103462	A	15-08-2000	US 2002119444 A1	29-08-2002
US 5837464	A	17-11-1998	US 6242187 B1	05-06-2001
			US 2003008282 A1	09-01-2003
WO 0066774	A	09-11-2000	AU 4586700 A	17-11-2000
			EP 1226270 A2	31-07-2002
			WO 0066774 A2	09-11-2000
			JP 2002542804 T	17-12-2002

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demand nationale No
PCT/FR 01/03512A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE
CIB 7 C12Q1/70 C12N15/86

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 7 C12Q C12N

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS, MEDLINE, CHEM ABS Data, EMBASE, SEQUENCE SEARCH

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	US 6 103 462 A (CHARNEAU PIERRE ET AL) 15 août 2000 (2000-08-15) cité dans la demande	1-4, 29-34
Y	le document en entier	5-28, 35-43
Y	KELLAM P ET AL: "RECOMBINANT VIRUS ASSAY: A RAPID, PHENOTYPIC ASSAY FOR ASSESSMENT OF DRUG SUSCEPTIBILITY OF HUMAN IMMUNODEFICIENCY VIRUS TYPE 1 ISOLATES" ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY, AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY, WASHINGTON, DC, US, vol. 38, no. 1, janvier 1994 (1994-01), pages 23-30, XP000952459 ISSN: 0066-4804 cité dans la demande le document en entier	5,6,9, 35,42



Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents



Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

* Catégories spéciales de documents cités:

- *A* document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- *E* document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- *L* document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- *O* document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- *P* document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

T document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention

X document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément

Y document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier

Z document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

21 février 2003

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

03/03/2003

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale

Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Reuter, U

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
Y	ROBINSON LAURENCE H ET AL: "HIV type 1 protease cleavage site mutations and viral fitness: Implications for drug susceptibility phenotyping assays." AIDS RESEARCH AND HUMAN RETROVIRUSES, vol. 16, no. 12, août 2000 (2000-08-10), pages 1149-1156, XP002183817 ISSN: 0889-2229 le document en entier ---	7,8
Y	HEILEK-SNYDER G M ET AL: "Measuring HIV-1 integrase inhibitor susceptibility using a recombinant virus-based, single cycle replication assay." ABSTRACTS OF THE INTERSCIENCE CONFERENCE ON ANTIMICROBIAL AGENTS AND, vol. 40, 2000, page 300 XP001025652 40th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy; Toronto, Ontario, Canada; September 17-20, 2000, 2000 abrégé ---	10-12,36
Y	SCARLATTI GABRIELLA ET AL: "In vivo evolution of HIV-1 co-receptor usage and sensitivity to chemokine-mediated suppression." NATURE MEDICINE, vol. 3, no. 11, novembre 1997 (1997-11), pages 1259-1265, XP001024255 ISSN: 1078-8956 le document en entier ---	13-28, 37-41,43
Y	WILLEY ET AL: "Amino acid substitutions in the human immunodeficiency virus type 1 gp120 V3 loop that change viral tropism also alter physical and functional properties of the virion envelope" JOURNAL OF VIROLOGY, THE AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY, US, vol. 68, no. 7, juillet 1994 (1994-07), pages 4409-4419, XP002119922 ISSN: 0022-538X le document en entier ---	13-28, 37-41,43
Y	LIN PIN-FANG ET AL: "Characterization of siamycin I, a human immunodeficiency virus fusion inhibitor." ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY, vol. 40, no. 1, 1996, pages 133-138, XP001016383 ISSN: 0066-4804 le document en entier ---	13-28, 37-41,43
	--- -/--	

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale No
PCT/FR 01/03512

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	<p>RACE ESTHER ET AL: "Analysis of HIV cross-resistance to protease inhibitors using a rapid single-cycle recombinant virus assay for patients failing on combination therapies." AIDS (HAGERSTOWN), vol. 13, no. 15, 22 octobre 1999 (1999-10-22), pages 2061-2068, XP001016325 ISSN: 0269-9370 le document en entier</p> <p style="text-align: center;">---</p>	1-4, 29-34
A	<p>US 5 837 464 A (CAPON DANIEL ET AL) 17 novembre 1998 (1998-11-17) le document en entier</p> <p style="text-align: center;">---</p>	1-43
A	<p>HERTOGS K ET AL: "A RAPID METHOD FOR SIMULTANEOUS DETECTION OF PHENOTYPIC RESISTANCE TO INHIBITORS OF PROTEASE AND REVERSE TRANSCRIPTASE IN RECOMBINANT HUMAN IMMUNODEFICIENCY VIRUS TYPE 1 ISOLATES FROM FROM PATIENTS TREATED WITH ANTIRETROVIRAL DRUGS" ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY, AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY, WASHINGTON, DC, US, vol. 42, no. 2, février 1998 (1998-02), pages 269-278, XP000946883 ISSN: 0066-4804 le document en entier</p> <p style="text-align: center;">---</p>	1-43
A	<p>MARTINEZ-PICADO J ET AL: "ANTIRETROVIRAL RESISTANCE TESTING. HUMAN IMMUNODEFICIENCY VIRUS TYPE 1 CLONING VECTORS FOR" JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY, WASHINGTON, DC, US, vol. 37, no. 9, septembre 1999 (1999-09), pages 2943-2951, XP000886935 ISSN: 0095-1137 le document en entier</p> <p style="text-align: center;">---</p>	1-43
A	<p>WO 00 66774 A (BLAIR EDWARD DUNCAN ; ROBINSON LAURENCE HENRY (GB); SNOWDEN BARBARA) 9 novembre 2000 (2000-11-09) page 5 page 11-17; figure 3</p> <p style="text-align: center;">---</p> <p style="text-align: center;">-/--</p>	1-43

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
P,X	<p>TROUPLIN VIRGINIE ET AL: "Determination of coreceptor usage of human immunodeficiency virus type 1 from patient plasma samples by using as recombinant phenotypic assay." JOURNAL OF VIROLOGY, vol. 75, no. 1, janvier 2001 (2001-01), pages 251-259, XP002183818 ISSN: 0022-538X le document en entier</p>	1,2,13, 20,21, 27-33,41
P,X	<p>MASQUELIER BERNARD ET AL: "Genotypic and phenotypic resistance patterns of human immunodeficiency virus type 1 variants with insertions or deletions in the reverse transcriptase (RT): Multicenter study of patients treated with RT inhibitors." ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY, vol. 45, no. 6, juin 2001 (2001-06), pages 1836-1842, XP001016398 ISSN: 0066-4804 le document en entier</p>	1,2,5,6, 9,29-33, 35,42

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Dem internationale n°
PCI/FR 01/03512

Cadre I Observations – lorsqu'il a été estimé que certaines revendications ne pouvaient pas faire l'objet d'une recherche (suite du point 1 de la première feuille)

Conformément à l'article 17.2(a), certaines revendications n'ont pas fait l'objet d'une recherche pour les motifs suivants:

1. ☐ Les revendications n°
se rapportent à un objet à l'égard duquel l'administration n'est pas tenue de procéder à la recherche, à savoir:

2. ☐ Les revendications n°
se rapportent à des parties de la demande internationale qui ne remplissent pas suffisamment les conditions prescrites pour qu'une recherche significative puisse être effectuée, en particulier:

3. ☐ Les revendications n°
sont des revendications dépendantes et ne sont pas rédigées conformément aux dispositions de la deuxième et de la troisième phrases de la règle 6.4.a).

Cadre II Observations – lorsqu'il y a absence d'unité de l'invention (suite du point 2 de la première feuille)

L'administration chargée de la recherche internationale a trouvé plusieurs inventions dans la demande internationale, à savoir:

voir feuille supplémentaire

1. ☐ Comme toutes les taxes additionnelles ont été payées dans les délais par le déposant, le présent rapport de recherche internationale porte sur toutes les revendications pouvant faire l'objet d'une recherche.

2. ☒ Comme toutes les recherches portant sur les revendications qui s'y prétaient ont pu être effectuées sans effort particulier justifiant une taxe additionnelle, l'administration n'a sollicité le paiement d'aucune taxe de cette nature.

3. ☐ Comme une partie seulement des taxes additionnelles demandées a été payée dans les délais par le déposant, le présent rapport de recherche internationale ne porte que sur les revendications pour lesquelles les taxes ont été payées, à savoir les revendications n°

4. ☐ Aucune taxe additionnelle demandée n'a été payée dans les délais par le déposant. En conséquence, le présent rapport de recherche internationale ne porte que sur l'invention mentionnée en premier lieu dans les revendications; elle est couverte par les revendications n°

Remarque quant à la réserve

- ☐ Les taxes additionnelles étaient accompagnées d'une réserve de la part du déposant.
- ☐ Le paiement des taxes additionnelles n'était assorti d'aucune réserve.

SUITE DES RENSEIGNEMENTS INDIQUES SUR PCT/ISA/ 210

L'administration chargée de la recherche internationale a trouvé plusieurs (groupes d') inventions dans la demande internationale, à savoir:

1. revendications: 1,2,29-33 (partiellement) et 3,4,34 (complètement)

Méthode d'analyse d'une caractéristique phénotypique des virus VIH, caractérisée en ce que l'amplification par PCR est réalisée avec une paire d'amorces encadrant une séquence d'acide nucléique codant pour une partie de la protéine gag et une séquence d'acide nucléique codant pour la protéase du virus de l'immunodéficience humain et kit caractérisé en ce qu'il comprend les dites amorces.

2. revendications: 1,2,29-33 (partiellement) et 5,6,9,35, 42 (complètement)

Méthode d'analyse d'une caractéristique phénotypique des virus VIH caractérisée en ce que l'amplification par PCR est réalisée avec une paire d'amorces encadrant une séquence d'acide nucléique susceptible de porter au moins une mutation dans le gène codant pour la transcriptase inverse et kit caractérisé en ce qu'il comprend les dites amorces.

3. revendications: 1,2,29-32 (partiellement) et 7,8 (complètement)

Méthode d'analyse d'une caractéristique phénotypique des virus VIH, caractérisée en ce que l'amplification par PCR est réalisée avec une paire d'amorces encadrant une séquence d'acide nucléique codant pour une partie de la protéine gag, pour la protéase et pour une partie de la transcriptase inverse du virus de l'immunodéficience humaine.

4. revendications: 1,2,29-33 (partiellement) et 10-12, 36 (complètement)

Méthode d'analyse d'une caractéristique phénotypique des virus VIH caractérisée en ce que l'amplification par PCR est réalisée avec une paire d'amorces encadrant une séquence d'acide nucléique susceptible de porter au moins une mutation dans le gène codant pour l'intégrase et kit caractérisé en ce qu'il comprend les dites amorces.

5. revendications: 1,2,29-33 (partiellement) et 13-28,37-41, 43 (complètement)

Méthode d'analyse d'une caractéristique phénotypique des virus VIH, caractérisée en ce que l'amplification par PCR

SUITE DES RENSEIGNEMENTS INDICUES SUR PCT/SA/ 210

est réalisée avec une paire d'amorces encadrant une séquence d'acide nucléique susceptible de porter au moins une mutation dans le gène codant pour la protéine d'enveloppe et kit caractérisé en ce qu'il comprend les dites amorces.

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demande internationale No

PCT/FR 01/03512

Document brevet cité au rapport de recherche		Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
US 6103462	A	15-08-2000	US 2002119444 A1	29-08-2002
US 5837464	A	17-11-1998	US 6242187 B1	05-06-2001
			US 2003008282 A1	09-01-2003
WO 0066774	A	09-11-2000	AU 4586700 A	17-11-2000
			EP 1226270 A2	31-07-2002
			WO 0066774 A2	09-11-2000
			JP 2002542804 T	17-12-2002

**NOVEL METHOD FOR ANALYSING PHENOTYPIC CHARACTERISTICS OF
HUMAN IMMUNODEFICIENCY VIRUS (HIV)
NOUVELLE METHODE D'ANALYSE DES CARACTERISTIQUES
PHENOTYPIQUES DES VIRUS DE L'IMMUNODEFICIENCE HUMAINE (VIH)**

Patent Applicant/Assignee:

BIOALLIANCE PHARMA, 59, rue du General Martial Valin, F-75015 Paris, FR,
FR (Residence), FR (Nationality), (For all designated states except: US)
INSERM, 101, rue de Tolbiac, F-75654 Paris Cedex 13, FR, FR (Residence), FR
(Nationality), (For all designated states except: US)

Patent Applicant/Inventor:

CLAVEL Francois, 31, boulevard Malesherbes, F-75008 Paris, FR, FR
(Residence), FR (Nationality), (Designated only for: US)
MAMMANO Fabrizio, 43, rue Reaumur, F-75003 Paris, FR, FR (Residence), FR
(Nationality), (Designated only for: US)
RACE Esther, 62, avenue Aristide Briand, F-92120 Montrouge, FR, FR
(Residence), FR (Nationality), (Designated only for: US)
DAM Elisabeth, 87, rue Championnet, F-75018 Paris, FR, FR (Residence), FR
(Nationality), (Designated only for: US)
OBRY Veronique, 31bis, avenue Joffre, F-92250 La Garenne-Colombes, FR, FR
(Residence), FR (Nationality), (Designated only for: US)
TROUPLIN Virginie, 70, avenue d'Italie, F-75013 Paris, FR, FR (Residence), FR
(Nationality), (Designated only for: US)

Legal Representative:

BREESE Pierre (et al) (agent), Breese-Majerowicz, 3, avenue de l'Opera, F-75001
Paris, FR, ,

Patent and Priority Information (Country, Number, Date):

Patent: WO 200238792 A2-A3 20020516 (WO 0238792)

Application: WO 2001FR3512 20011109 (PCT/WO FR0103512)

Priority Application: FR 200014495 20001110; FR 20013970 20010323; US
2001817135 20010327

Designated States:

AE AG AL AM AT AU AZ BA BB BG BR BY BZ CA CH CN CO CR CU CZ
DE DK DM DZ EC EE ES FI GB GD GE GH GM HR HU ID IL IN IS JP KE
KG KP KR KZ LC LK LR LS LT LU LV MA MD MG MK MN MW MX MZ
NO NZ OM PH PL PT RO RU SD SE SG SI SK SL TJ TM TR TT TZ UA UG
US UZ VN YU ZA ZW
(EP) AT BE CH CY DE DK ES FI FR GB GR IE IT LU MC NL PT SE TR
(OA) BF BJ CF CG CI CM GA GN GQ GW ML MR NE SN TD TG
(AP) GH GM KE LS MW MZ SD SL SZ TZ UG ZW
(EA) AM AZ BY KG KZ MD RU TJ TM

International Patent Class (Main): C12Q-001/70

International Patent Class: C12N-015/86

Publication Language: French

Filing Language: French

English Abstract: The invention concerns a method for analysing characteristics exhibited by certain virus strains, in particular, the human immunodeficiency viruses, using the construct of a recombinant virus obtained by homologous recombining. The invention also concerns a kit comprising primers, vectors, cell hosts, products and reagents necessary for producing PCR amplification, and the products and reagents for detecting a marker, for implementing the inventive method.

U.S. Equivalents:

WO0238792

US2002123036A1 [Equivalent of WO0238792]

US2003207294A1 [Equivalent of WO0238792]

US2004053219A1 [Equivalent of WO0238792]

US2004101828A1 [Equivalent of WO0238792]

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record.**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☒ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER: _____**

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.

THIS PAGE BLANK (USPTO)